

DISSERTATION

Das Dauerstadium als Präadaptation - eine vergleichende systembiologische Analyse einer möglichen evolutionären Zwischenstufe in Rundwürmern

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Biol. Zisong Chang

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Richard Lucius
2. Prof. Dr. Matthias Selbach
3. PD Dr. Adrian Streit

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2014

Zusammenfassung

Wie entstanden parasitäre Lebensformen im Laufe der Evolution und welche molekularen Anpassungen sind dafür entscheidend? Nematoden (Fadenwürmer, auch Rundwürmer genannt) sind ein attraktives System um dieser Frage nachzugehen. Die Phylogenie der Fadenwürmer unterstützt die Hypothese, dass parasitäre Arten aus freilebenden Arten hervorgegangen sind. Genomweite Analysen für verschiedene Nematodenarten aus unterschiedlichen ökologischen Hintergründen stellen einen Ausgangspunkt dar, um diese Hypothese zu analysieren [Dieterich and Sommer, 2009]. Im Mittelpunkt des Interesses steht das Dauerstadium in freilebenden Arten, welches große morphologische und entwicklungsbiologische Ähnlichkeiten zu infektiösen Larven parasitär lebender Arten aufweist. In der evolutionären Entwicklungsbiologie wurden Dauerstadien als Präadaptationen für den Übergang zur parasitären Lebensweise ursprünglicher, freilebender Nematoden definiert. Die Präadaptation ist eine Eigenschaft, welche sich als Anpassung an bestehenden Lebensbedingungen entwickelt und die Entstehung einer neuen Eigenschaft erleichtert [Osche, 1956; Poulin, 2007]. Neue Erkenntnisse auf molekularer Ebene lassen ebenfalls eine gemeinsame evolutionäre Historie vermuten. Ein konservierter endokriner Mechanismus steuert die Ausprägung von Dauerlarven und infektiöser Larven in mehreren entfernt verwandten Nematodenarten [Ogawa, et al., 2009]. Es handelt sich hierbei um ein Modul aus einem nukleären Hormonrezeptor (DAF-12) und dem daran bindenden Hormon (Dafachronsäuren). In diesem Kontext wurden molekulare Signaturen in drei verschiedenen Gattungen untersucht: *Caenorhabditis*, *Pristionchus* und *Strongyloides*.

Die Promotionsarbeit umfasst vier Teilbereiche: 1) Vergleichende Analyse von Dauer- und infektiösen Larven auf der RNA-Ebene; 2) Ausführliche vergleichende molekulare Analyse von Transkriptom und Proteom während Dauerstadium und Daueraustritt in *C. elegans* und *C. briggsae*; 3) Dynamische Remodellierung vom Proteom beim Austritt aus dem Dauerstadium in *C. elegans*; 4) Etablierung eines neuen transkriptom-weiten Assays für die Charakterisierung post-transkriptioneller regulatorischer Elemente in *C. elegans*.

Wir fanden konservierte molekulare Signaturen der Regulation durch $\Delta 7$ -DA und Ascarosid bei Dauer- und infektiösen Larven. Danach wurde die hohe Konservierung durch unsere Analyse in

Dauer- und Postdauer-Stadium zwischen den zwei nah verwandten freilebenden Arten *C. elegans* und *C. briggsae* identifiziert. Das heißt, dass die relative Veränderung auf mRNA- oder Protein-Ebene zwischen zwei Arten stark korreliert ist. Aber die relative Veränderung innerhalb derselben Art zeigt keine hochgradige Korrelation zwischen mRNA- und Protein-Ebene. Unsere Ergebnisse zeigen in *C. elegans* Dauerlarven die signifikante Reduzierung der RNA-Mengen in 20 Stoffwechselwegen. Im Gegensatz dazu speicherten Dauerlarven reichlich RNA-Mengen in GO Termen wie *Ribosome* und *Aminoacyl-tRNA biosynthesis*. Auf Protein-Ebene sind die Stoffwechselwege von Proteinsynthese und Proteinverarbeitung im endoplasmatischen Retikulum in Dauerlarven herunterreguliert und GO Terme wie *Lysosome* sind hochreguliert. Durch die Zeitreihenanalyse der Proteom-Remodellierung der molekularen Signaturen beim Austritt aus dem Dauer-Stadium fand wir, dass GO Terme wie *metal ion binding* signifikant herunterreguliert sind und der Proteinabbau hochreguliert ist. Unsere Ergebnisse vom pSILAC Experiment deuten an, dass die Proteine für Energieerzeugung und Chaperone/Proteinfaltung beim Daueraustritt schnell verbraucht sind und wieder hergestellt werden. Zum Schluss haben wir als Erste den popomR-Assay in *C. elegans* etabliert und ein Screening der vermeintlichen Proteinbindestellen auf poly-A-RNA durchgeführt, um in der Zukunft die konservierten Mechanismen der post-transkriptionellen Regulation durch RBPs im Dauer-Stadium zu analysieren.

Schlagwörter: Nematode, Caenorhabditis, Pristionchus, Strongyloides, Dauerlarven, infektiöse Larven, freilebend, parasitär, evolutionäre Entwicklungsbiologie, Dauerstadium, Postdauer, Daueraustritt, post-transkriptionelle Regulation, Transkriptom, Proteom, RNA-seq, LC-MS/MS, popomR.

Abstract

How did parasitic life-forms arise in evolution and which molecular adaptations are essential for it? Nematodes or roundworms are an attractive system to investigate this question. The phylogeny of nematodes supports the hypothesis that parasitic species evolved from free-living species. Genome-wide analyses among different nematode species from diverse ecological backgrounds provide a starting point to test this hypothesis [Dieterich and Sommer, 2009]. In the limelight is the dauer stage in free-living nematode species, which are great morphologically and developmentally similar to infective larvae in parasitic species. Dauer stages were defined in evolutionary developmental biology (evo-devo) as pre-adaptation for the transition to parasitic life-form from original free-living nematodes. The pre-adaptation is a feature that has been developed as an adaptation to living conditions but at the same time lightens the development of a new feature [Osche, 1956; Poulin, 2007]. New insights on the molecular level also suggest a common evolutionary history between them. A conserved endocrine mechanism controls the formation of dauer larvae and infective larvae in several distant related nematode species [Ogawa *et al.*, 2009]. This module involves a nuclear hormone receptor (DAF-12) and the binding hormone (dafachronic acid). In this context, molecular signatures were studied by us in three different genera: *Caenorhabditis*, *Pristionchus* and *Strongyloides*. This thesis consists of four parts: 1) Comparative analysis of dauer and infective larvae on the RNA level; 2) Detailed comparative molecular analysis of transcriptome and proteome during dauer stage and dauer exit in *C. elegans* and *C. briggsae*; 3) Dynamic remodeling of proteome during dauer exit in *C. elegans*; 4) Establishment of a new transcriptome-wide assays to characterise the post-transcriptional regulatory elements in *C. elegans*.

We found the conservation of molecular signatures by regulating with $\Delta 7$ -DA and Ascarosid in dauer larvae and infective larvae. Then by our comparative analysis, the high degree of conservation between two closely related free-living species *C. elegans* and *C. briggsae* was identified in dauer and post-dauer stages. This means that the relative changes are strongly correlated on the mRNA or the protein level between two species. But the relative changes in the same species don't show any strong correlation between the mRNA and the protein levels. Our results showed a significantly reduced amount of RNA in 20 metabolic pathways in *C. elegans* dauer larvae. In contrast, dauer larvae stored a large amount of RNA in GO terms such as ribosome and aminoacyl-tRNA

biosynthesis. On the protein level, the metabolic pathways of protein synthesis and protein processing in endoplasmic reticulum were downregulated in dauer larvae and the term of lysosome was up-regulated. Due to time course analysis for proteome remodeling of molecular signatures during exit process from dauer stage, we found that GO terms such as metal ion binding were significantly downregulated during dauer exit and at the same time the protein degradation was up-regulated. Our results of pSILAC experiment suggest that the proteins for energy generation and chaperone/protein folding are quickly spent and rebuilt during dauer exit. Finally, we were the first to establish the popomR assay in *C. elegans* and performed a screening of the putative protein binding sites on poly-A RNA to analyze the conserved mechanisms of post-transcriptional regulation by RBPs in dauer larvae in the future.

Keywords: nematode, *Caenorhabditis*, *Pristionchus*, *Strongyloides*, dauer larvae, infective larvae, free-living, parasitic, evolutionary developmental biology, dauer stage, postdauer, dauer exit, post-transcriptional regulation, transcriptome, proteome, RNA-seq, LC-MS/MS, popomR.

All of this has happened before, and all of this will happen again.

— aus dem Science-Fiction-Film "*Battlestar Galactica*"

Danksagung

Danken möchte ich in erster Linie meinem Betreuer, Herrn Dr. Dieterich, für die Themenstellung und besonders für seine ausgiebige Unterstützung. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Lucius, der stets für mich ansprechbar war und mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und motiviert hat. Ich möchte mich auch herzlich bei meinen Kollegen Antje Hirsehorn, Dr. Markus Schüler, Dr. Chris Bielow und Dr. Sebastian Fröhler bedanken, die viel Zeit in die Korrektur dieser Arbeit investiert haben. Zahlreiche orthographische und grammatikalische Korrekturen flossen dank ihrer Hilfe hinein.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und mich in all meinen Entscheidungen unterstützt haben. Ganz besonders danken möchte ich natürlich auch meiner Familie, insbesondere meiner lieben Frau Ting Li, die wohl am intensivsten die Hochs und Tiefs eines Doktorandenlebenszyklus erfahren musste und sich gleichzeitig um unseren Sohn und unsere Tochter gekümmert hat. Ich liebe Euch. Ohne Eure Nachsicht und liebevolle Begleitung hätte ich diese Arbeit wohl nie zustande gebracht.

Berlin, im April 2014

Zisong Chang

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Zusammenfassung | I |
| Abstract | III |
| Motto | V |
| Danksagung | VI |
| Inhaltsverzeichnis | VII |
| Abkürzungsverzeichnis | IX |
| Abbildungsverzeichnis | X |
| Tabellenverzeichnis | XI |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Phylognese der Nematoden | 1 |
| 1.2 Motivation und Ziele unserer Forschung | 3 |
| 1.3 Parasitäre Nematoda: <i>Strongyloides ratti</i> und <i>Strongyloides stercoralis</i> | 4 |
| 1.4 Der Modellorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i> | 7 |
| 1.5 <i>Caenorhabditis briggsae</i> | 9 |
| 1.6 Mögliche Zwischenform: <i>Pristionchus pacificus</i> | 10 |
| 1.7 Der Lebenszyklus von freilebenden Nematoden und Dauerlarven | 11 |
| 2. Materialien und Methoden | 19 |
| 2.1 Methoden | 19 |
| 2.1.1 Wurmstämme und Kultivierung | 19 |
| 2.1.2 Präparation und Aufreinigung der Würmer | 20 |
| 2.1.3 pSILAC (engl. <i>pulsed stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>) | 21 |
| 2.1.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Würmern | 21 |
| 2.1.5 Präparation der Libraries für RNA-seq | 22 |
| 2.1.6 Protein Präparation und Shotgun Proteomik | 22 |
| 2.1.7 Real-Time-quantitative-PCR (qPCR) | 24 |
| 2.1.8 Zählung durch Biosorter und Extraktion von Gesamt-RNA und Gesamt-Protein | 24 |
| 2.1.9 <i>Protein occupancy profiling of mRNA</i> (popomR) | 25 |
| 2.1.10 Silberfärbung | 26 |
| 2.1.11 Bioinformatische Analyse | 26 |
| 2.2 Materialien | 29 |
| 2.2.1 Wurmstämme und Bakterien | 29 |
| 2.2.2 Geräte und Zubehöre | 29 |
| 2.2.3 Medium und Pufferlösung | 31 |
| 2.2.4 Kits | 33 |
| 2.2.5 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien | 33 |
| 2.2.6 Real-Time PCR Primer | 36 |
| 2.2.7 Bioinformatische Datensätze für Proteome | 36 |
| 3. Ergebnisse | 37 |
| 3.1 Vergleichende Analyse von Dauer- und infektiösen Larven auf der RNA-Ebene | 37 |
| 3.2 Ausführliche vergleichende molekulare Analyse von Transkriptom und Proteom während Dauerstadium und Daueraustritt in <i>C. elegans</i> und <i>C. briggsae</i> | 48 |

| | |
|--|------------|
| 3.2.1 Vergleich von Dauerlarven zu nicht-Dauer Mix und Larven beim Daueraustritt zur Kontrolle der Dauerlarven..... | 48 |
| 3.2.2 Analyse der Rohdaten von RNA-seq und LC-MS/MS für nicht-Dauer Mix, Dauerlarven und Daueraustritt T=8 h | 49 |
| 3.2.3 Dauer- und Daueraustritt-spezifische Proteine..... | 51 |
| 3.2.4 Hohe Konservierung von relativen Expressionsänderungen im Artenvergleich von Transkriptom und Proteom | 51 |
| 3.2.5 Mögliche funktionelle Bedeutung der Veränderung der Genexpression in Dauerlarven und beim Daueraustritt von <i>C. elegans</i> | 55 |
| 3.2.6 Molekulare Signaturen des Dauerstadiums im genetischen Informationsfluss | 59 |
| 3.2.7 Dauer-spezifische miRNA-Biogenese zur Steuerung der Genexpression | 62 |
| 3.3 Dynamische Remodellierung vom Proteom beim Daueraustritt in <i>C. elegans</i> | 65 |
| 3.3.1 Anstieg der Gesamt-RNA-Menge und Proteinmenge in <i>C. elegans</i> beim Daueraustritt..... | 65 |
| 3.3.2 Signifikante dynamische Veränderungen der Proteinmenge beim Daueraustritt..... | 66 |
| 3.3.3 Monitoring der Proteinsynthese beim Daueraustritt durch pSILAC..... | 76 |
| 3.4 Etablierung eines neuen transkriptom-weiten Assays für die Charakterisierung post-transkriptioneller regulatorischer Elemente in <i>C. elegans</i>..... | 84 |
| 3.4.1 <i>In vivo</i> Markierung der Würmer mit photoaktivierbaren Ribonukleotiden | 84 |
| 3.4.2 UV-Quervernetzung durch photoaktivierbare Ribonukleotide und poly-A-RNA-Präzipitation..... | 85 |
| 3.4.3 Verteilung der charakterisierten Basenpaarsubstitutionen auf den poly-A-RNA-Molekülen | 86 |
| 3.4.4 <i>daf-21</i> als Beispiel für die popomR-Analyse..... | 92 |
| 4. Diskussion | 95 |
| 4.1 Konservierte molekulare Signaturen der Regulation durch $\Delta 7$ -DA und Ascarosid bei Dauer- und infektiösen Larven..... | 95 |
| 4.2 Molekulare Signatur des Dauer- und Postdauer-Stadiums | 96 |
| 4.3 Zeitreihenanalyse der Proteom-Remodellierung beim Daueraustritt | 97 |
| 4.4 Detektierung der konservierten Proteinbindestellen durch den popomR-Assay | 98 |
| 4.5 Vergleichende Analyse der molekularen Signaturen des Dauer-Stadium in der evolutionären Entwicklungsbiologie..... | 99 |
| Literaturverzeichnis..... | 101 |
| Anhang..... | 123 |
| Selbstständigkeitserklärung | 133 |
| Lebenslauf | |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| CAZyme | <i>Carbohydrate-Active enZyme</i> |
| DA | <i>Dafachronsäure, Dafachronic Acid</i> |
| EST | <i>Expressed Sequence Tag</i> |
| FC | <i>Foldchange, Fold Change</i> |
| FPKM | <i>Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped</i> |
| GO | <i>Gen-Ontologie, Gene Ontology</i> |
| GSEA | <i>Gene Set Enrichment Analysis</i> |
| HGT | <i>horizontaler Gentransfer, Horizontal Gene Transfer</i> |
| LC-MS/MS | <i>Liquid-Chromatographie-Tandem-Massenspektrometrie</i> |
| NGS | <i>Next Generation Sequencing</i> |
| popomR | <i>protein occupancy profiling of mRNA</i> |
| pSILAC | <i>pulsed Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture</i> |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1-1 Systematik und phylogenetischer Stammbaum von Nematoden | 2 |
| Abb. 1-2 <i>Strongyloides ratti</i> | 5 |
| Abb. 1-3 Lebenszyklus von <i>Strongyloides</i> | 6 |
| Abb. 1-4 Adulte <i>C. elegans</i> Hermaphrodite | 7 |
| Abb. 1-5 Die wichtigsten wissenschaftlichen Erkenntnisse über <i>C. elegans</i> im 20. Jahrhundert | 9 |
| Abb. 1-6 Lebenszyklus von <i>C. elegans</i> bei 22 °C | 12 |
| Abb. 1-7 Die spezifische Struktur der Kutikula für verschiedene Entwicklungsstadien | 13 |
| Abb. 1-8 Die Fortsätze der Kutikula | 13 |
| Abb. 1-9 Mundhöhle von <i>C. elegans</i> Adult (A) und Dauerlarven (B) | 14 |
| Abb. 1-10: Niktation bei <i>C. elegans</i> Dauerlarven | 16 |
| Abb. 3-1 Paarweise Korrelation von FPKM-Werten aus RNA-seq in vier Nematodenspezies | 38 |
| Abb. 3-2 Proteinsequenzvariation und Expressionsänderung für die Orthologen von DAF-9 (T13C5.1) | 38 |
| Abb. 3-3 Korrelation von Gesamtlängen der Äste auf den Bäumen für Proteinsequenzvariation und für Expressionsänderung in orthologen Gengruppen aus Dauer- und infektiösen Larven | 39 |
| Abb. 3-4 Ein Modell der charakterisierten Pathways zur Regulation der Dauerbildung | 41 |
| Abb. 3-5 Proteinsequenzvariation und Expressionsänderung für die Proteinfamilie von DAF-21 ... | 47 |
| Abb. 3-6 Schematische Darstellung der Kultivierung und Präparation von Wurmproben | 48 |
| Abb. 3-7 Vergleichen der Detektion von RNA-seq und shotgun Proteomik für drei biologischen Bedingungen von <i>C. elegans</i> und <i>C. briggsae</i> | 50 |
| Abb. 3-8 Qualitätskontrolle der Normalisierungsverfahren für die Proteom-Daten | 50 |
| Abb. 3-9 Korrelationen der Genexpression zwischen zwei Arten auf mRNA- und Proteinebene | 52 |
| Abb. 3-10 Korrelationen der Genexpression zwischen mRNA- und Proteinebene innerhalb derselben Art | 53 |
| Abb. 3-11 Die zehn signifikantesten Kategorien der divergent exprimierten PFAM-Genfamilien von Dauerlarven zu nicht-Dauer zwischen <i>C. elegans</i> und <i>C. briggsae</i> | 54 |
| Abb. 3-12 Die zehn signifikantesten Kategorien der divergent exprimierten PFAM-Genfamilien von Daueraustritt T=8 h zu T=0 h zwischen <i>C. elegans</i> und <i>C. briggsae</i> | 54 |
| Abb. 3-13 KEGG Pathway-Gene-Set Anreicherungsanalyse für RNA-seq Daten-Set | 56 |
| Abb. 3-14 KEGG Pathway-Gene-Set Anreicherungsanalyse für Proteom Daten-Set | 57 |
| Abb. 3-15 Molekulare Signaturen des Dauerstadiums im genetischen Informationsfluss | 61 |
| Abb. 3-16 Der Pathway der miRNA-Biogenese und Mapping mit RNA-seq und Protein-Daten | 63 |
| Abb. 3-17 Die relative mRNA-Mengenänderung für den Pathway von miRNA-Biogenese durch die Detektierung von qPCR und RNA-seq | 64 |
| Abb. 3-18 Gesamt-RNA und Gesamt-Protein Anteil pro Wurm in <i>C. elegans</i> Proben beim Daueraustritt | 65 |
| Abb. 3-19 <i>E.coli</i> Kontamination in drei <i>C. elegans</i> Proteom Datensätzen beim Daueraustritt | 66 |
| Abb. 3-20 Paarweise Korrelation von Peptid-Intensitäten der Proteingruppen in drei biologischen Replikaten für label-freies Daueraustritts-Experiment | 67 |
| Abb. 3-21 Heatmap für die relative Veränderung der Proteinmenge beim Daueraustritt in Exp. 23 | 68 |
| Abb. 3-22 Boxplots für die relative Protein-Mengenänderung beim Daueraustritt in Exp. 23 | 68 |

| | |
|---|----|
| Abb. 3-23 Die Anreicherung nach der funktionellen Annotation durch DAVID für die Proteine in Cluster 2 | 69 |
| Abb. 3-24 Die Anreicherung nach der funktionellen Annotation durch DAVID für Cluster 4 und 6 | 73 |
| Abb. 3-25 Paarweise Korrelation der H/L-Verhältnisse für die Proben beim Daueraustritt T=8 h zwischen zwei biologischen Replikaten im pSILAC Experiment | 76 |
| Abb. 3-26 Die identifizierten leichten und schweren Proteingruppen der Proben beim Daueraustritt T=0 h und T=8 h | 77 |
| Abb. 3-27 Die Anreicherung von neu synthetisierten Proteinen der pSILAC-Proben beim Daueraustritt T=8 h nach der funktionellen Annotation durch DAVID..... | 77 |
| Abb. 3-28 Boxplots für die Cluster aus H/L-Verhältnissen beim Daueraustritt von T=0 bis 8 h in Exp. 70..... | 78 |
| Abb. 3-29 Die Anreicherung für die Proteingruppen in Cluster 1, 3 und 5 nach der funktionellen Annotation durch DAVID..... | 79 |
| Abb. 3-29 Venn-Diagramm für die Proteine in den Kategorien im Zusammenhang mit dem Energiemetabolismus..... | 81 |
| Abb. 3-30 Dot-Blot von 3 µg Gesamt-RNA für die <i>in vivo</i> Markierung..... | 85 |
| Abb. 3-31 SDS-PAGE und Silberfärbung für Würmer mit oder ohne Quervernetzung bei 365 nm UV-Strahlung..... | 86 |
| Abb. 3-32 Basenpaarsubstitution von Thymin zu Cytosin während der reversen Transkription..... | 87 |
| Abb. 3-33 Auswertung des Read-Mappings auf genomischer Ebene und auf transkriptioneller Ebene | 88 |
| Abb. 3-34 Korrelation der Reads-Coverage und der TC-Positionen zwischen zwei biologischen Replikaten von jungen Adulten | 89 |
| Abb. 3-35 Verteilungen der TC-Positionen auf mRNA-Kompartimente und nach RNA-Typen | 91 |
| Abb. 3-36 Mapping der popomR-Reads und der TC-Übergänge auf dem Gen <i>daf-21</i> im UCSC Genome-Browser..... | 93 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tab. 3-1 Die Sequenzierungsergebnisse für das popomR Experiment..... | 89 |
|--|----|

1 Einleitung

1.1 Phylogenese der Nematoden

Nematoden oder Fadenwürmer sind einer der artenreichsten Stämme des Tierreichs. Vier Fünftel aller Individuen unter den vielzelligen Tieren sind Nematoden [Bongers and Ferris, 1999]. Im Laufe der Millionen Jahre dauernden Evolution wechselwirkten Nematoden mit verschiedenen ökologischen Nischen. In der Organismengruppe gibt es freilebende Arten und zahlreiche Parasiten, sowohl von Wirbellosen, Wirbeltieren als auch von Pflanzen. Die meisten Nematoden-Taxa wurden von Blaxter in fünf große monophyletische Gruppen, so genannte Kladen (engl. *Clade*), eingeteilt [Blaxter, 1998; Blaxter, 2011]. Andere Forscher, deren Definitionsgrundlage auf der Gesamtlänge von SSU rDNA Sequenzen basiert, charakterisierten zwölf Kladen [Holterman, et al., 2006; van Megan, et al., 2009]. In Abb. 1-1 optimieren wir die Benennung und Struktur der Kladen von Blaxter mit dem aktuelleren phylogenetischen Stammbaum von van Megan. Die Klade I Enoplia enthält freilebende Arten und Pflanzenparasiten. In der Klade II Dorylaimia treten neben freilebenden Arten auch tierische Parasiten und Pflanzenparasiten auf. Die Klade III Spirurina enthält nur tierische Parasiten, z.B. den den Menschen befallenden Spulwurm (*Ascaris lumbricoides*). Die Klade IV, die mit den Kladen III und V eine „Superklade“ bildet, enthält Nematoden mit verschiedenen Lebensstilen. Dazu gehört Strongyloides, ein parasitäres Genus mit einem faszinierenden, komplizierten Lebenszyklus [Grassi, 1879]. Der Klade V sind schließlich neben freilebenden Arten wie dem Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* auch wichtige tierische Parasiten zugeordnet, z.B. die Hakenwürmer, davon *Necator americanus* und *Ancylostoma duodenale*, die für den Menschen pathogen sind.

Mehr als 28.000 Nematodenspezies wurden beschrieben, mehr als 16.000 davon sind Parasiten [Jean-Pierre, et al., 2001]. Die parasitären Lebensstile haben sich in der Evolution der Nematoden mehrmals unabhängig voneinander entwickelt. Eine frühere Analyse deutet darauf hin, dass ein unabhängiges Entstehen des Parasitismus mindestens vier Mal bei Tieren und drei Mal bei Pflanzen auftrat [Blaxter, 1998].

Für unsere Studie wurden fünf Nematodenspezies aus drei Genera, die verschiedene Lebensstile vertreten, ausgewählt. *Caenorhabditis elegans* und *Caenorhabditis briggsae* sind freilebende *Caenorhabditis* Spezies, die zu Rhabditomorpha (Klade V) gehören. *Pristionchus pacificus* ist eine ebenfalls freilebende Spezies, die aber ökologisch häufig in einer wirtsspezifischen Assoziation mit

Skarabäen (Glückskäfer) gefunden wird. *Pristionchus* gehört in die Klasse Diplogasteromorpha, welche eine Schwesterklasse von Rhabditomorpha ist. Aus Strongyloididea in Klade IV wurden zwei Arten ausgewählt: *Strongyloides stercoralis* und *Strongyloides ratti* aus dem Genus *Strongyloides*, welche obligate gastrointestinale Parasiten von Wirbeltieren sind.

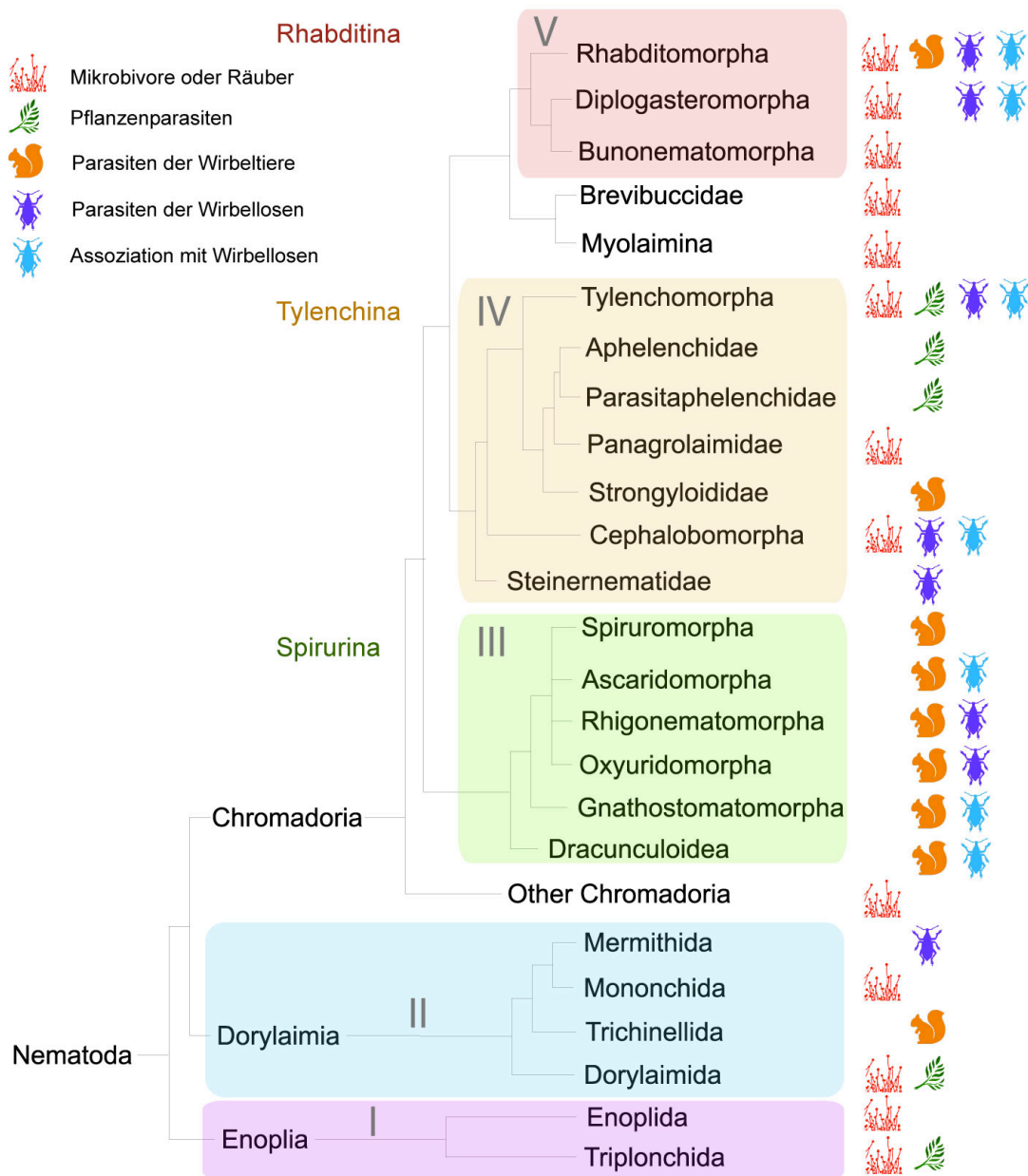


Abb. 1-1 Systematik und phylogenetischer Stammbaum von Nematoden

Die Benennung und Struktur der Kladen kommen aus der Arbeit von Blaxter [Blaxter, 1998; Blaxter, 2011], die Position und Beziehung im phylogenetischen Stammbaum stammen aus der Analyse von van Megen für die gesamten Längen von SSU rDNA Sequenzen [van Megen, et al., 2009].

1.2 Motivation und Ziele unserer Forschung

Wie entstand Parasitismus in der Evolution? Zur Beantwortung dieser Frage bietet sich Nematoda als ein gutes Modell an. Eine frühere Studie, bei der die Genome sechs verschiedener Nematodenspezies aus unterschiedlichen Ökosystemen verglichen wurden, gilt als Ausgangspunkt für die Analyse von Genen pflanzlicher und tierischer Parasiten [Dieterich and Sommer, 2009]. Bei parasitären Nematoden wurde horizontaler Gentransfer (HGT) identifiziert. Beispielsweise könnten die CAZyme (*Carbohydrate-Active enZyme*) zum Zellwandabbau von pflanzenparasitären Nematoden durch HGT erworben worden sein, weil diese Gene der CAZyme denen der Einzeller und Bakterien ähnlich sind und den meisten freilebenden Nematoden fehlen [Abad, et al., 2008; Opperman, et al., 2008; Smant, et al., 1998]. Einige parasitäre Merkmale entwickelten sich auch in freilebenden Arten, die ausgezeichnete Kandidaten zur Untersuchung der Entstehung von Parasitismus sind. Diese freilebenden Nematoden, wie *C. elegans*, können unter harten Bedingungen lange überleben oder sich ausbreiten, indem sie in ein alternatives Entwicklungsstadium eintreten und Dauerlarven ausprägen. Viele morphologische Merkmale der Dauerlarven ähneln denen infektiöser Larven parasitärer Nematoden. Auf dieser Beobachtung beruht die Vermutung von evolutionärer Verwandtschaft dieser Larvenarten [Hotez, et al., 1993]. In der evolutionären Entwicklungsbiologie wurden Dauerstadien als Präadaptationen für den Übergang zur parasitären Lebensweise ursprünglicher, freilebender Nematoden definiert. Die Präadaptation ist eine Eigenschaft, welche sich als Anpassung an Lebensbedingungen entwickelt und die Entstehung einer neuen Eigenschaft erleichtert [Osche, 1956; Poulin, 2007]. In unserer Studie werden die Dauerlarven von freilebenden *C. elegans* und *C. briggsae* sowie der möglichen Zwischenform *P. pacificus* mit infektiösen Larven der parasitären *S. stercoralis* und *S. ratti* verglichen. Außerdem wird der Prozess des Austritts aus dem Dauerstadium durch ein Zeitreihen-Experiment analysiert. Im Jahre 2009 wurde in einer Studie ein konservierter endokriner Mechanismus entdeckt, der die Bildung von Dauerlarven und infektiösen Larven in Nematoden steuern kann [Ogawa, et al., 2009]. Das konservierte Modul hat eine grundsätzliche Verknüpfung zwischen Dauer- und infektiösen Larven gezeigt. Andere Studien für die Genexpression von DAF-7 (TGF- β -like Ligand) in *C. elegans* und in parasitären Nematoden unterstützen diese Hypothese allerdings nicht [Viney, et al., 2005]. Der TGF- β -like Pathway ist ein gut untersuchter Mechanismus, der in *C. elegans* an der Determination der Dauerbildung beteiligt ist. Im „Post-genome Age“ haben mehr und mehr Wissenschaftler wahrgenommen, dass die alternative Transkription und post-transkriptionelle Regulation bei der Genexpression eine sehr wichtige Rolle spielen. Heutzutage können wir mit Hilfe von Sequenzier-

techniken der nächsten Generation (NGS), Shotgun Proteomik und der bioinformatischen Analyse der daraus gewonnenen Hochdurchsatz-Datensets die globale Veränderung der Komponenten auf RNA- und Protein-Ebene auswerten. In der Systembiologie überprüfen wir die Hypothese und suchen molekulare Hinweise darauf, dass heutige Dauerlarven und infektiöse Larven auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgehen, oder dieses Analog nur ein Beispiel der konvergenten Evolution durch Anpassung an eine ähnliche funktionelle Anforderung ist. Wenn die parasitären Nematoden von freilebenden Nematoden abstammen, erwarten wir ähnliche molekulare Signaturen bei Dauerlarven, infektiösen Larven und Zwischenformen auf dem evolutiven Weg in Richtung Parasitismus [Dieterich and Sommer, 2009].

1.3 Parasitäre Nematoda: *Strongyloides ratti* und *Strongyloides stercoralis*

Das Genus *Strongyloides* (Familie Strongyloididea, Klade IV) enthält ca. 50 Arten obligater gastrointestinaler Parasiten von Wirbeltieren [Speare, 1989]. *Strongyloides* besitzt meist nur einen spezifischen Wirt. Diese Spezifität ist seltsam bei tierischen parasitären Nematoda. *S. stercoralis* ist eine von zwei *Strongyloides* Arten, die Menschen infizieren. Sie verbreitet sich in tropischen und subtropischen Regionen [Schad, 1989]. Es wird geschätzt, dass ca. 100-200 Mio. Personen weltweit durch *Strongyloides* infiziert sind. Da eine *Strongyloides* Infektion schwer zu erkennen ist, könnte diese Zahl jedoch auch weitaus größer sein [Albonico, et al., 1999; Crompton, 1987]. *S. ratti* ist das Laboranalog zu *S. stercoralis*. Wie schon der Name besagt, ist *S. ratti* ein gastrointestinaler Parasit von Ratten. In einer Studie an wild-lebenden Ratten in Großbritannien betrug die Prävalenz von *S. ratti* 62% [Fisher and Viney, 1998].

Parasitäre *Strongyloides* Weibchen können in der Schleimhaut des Dünndarms von infizierten Wirten gefunden werden. In parasitären Stadien gibt es nur weibliche Adulte, die etwa 2 mm lang werden. Die Eier werden ausgeschieden und entwickeln sich außerhalb des Körpers zu infektiösen Larven, entweder direkt oder nach einer sexuell freilebenden Generation. Die infektiösen Larven können ihre infektiöse Fähigkeit für drei bis vier Wochen ohne Fütterung aufrechterhalten. In dieser Zeit infizieren sie den Wirt durch Eindringen in die Haut. Diese freilebende Generation ist nahezu einzigartig in Nematodenparasiten von Wirbeltieren. So ist *Strongyloides* besonders gut geeignet, die für die verschiedenen Lebensweisen relevanten Moleküle und Lebensbedingungen zu untersuchen. Nach dem Befall mit *S. ratti* besteht die Infektion des Wirts etwa einen Monat und einige Würmer können bis zu zehn Wochen überleben [Kimura, et al., 1999; Wilkes, et al., 2004]. Es

wurde sogar beobachtet, dass parasitäre Weibchen in „nude“ Ratten (Nacktratten) etwa ein Jahr (403 Tage) überleben [Gardner, et al., 2006]. Die maximale Lebensdauer freilebender *S. ratti* Weibchen beträgt hingegen nur fünf Tage [Gardner, et al., 2004]. Daraus ergibt sich ein 80-facher Unterschied in der Lebenserwartung der beiden weiblichen Formen [Gardner, et al., 2006].

Strongyloides weist eine außergewöhnliche Plastizität in seinem Lebenszyklus auf, der parasitäre und freilebende Generationen umfasst. Die Morphologie der parasitären unterscheidet sich zu der freilebender Generationen, so dass die beiden Phasen im 19. Jahrhundert als zwei verschiedene Arten beschrieben wurden [Bavay, 1876; Bavay, 1877].



Abb. 1-2 *Strongyloides ratti*

Ein parasitäres Weibchen von *S. ratti* (oben) Länge des Maßstabs: 30 μm , freilebende Weibchen und Männchen (jeweils unten links und rechts). Länge des Maßstabs: 50 μm . (Abbildungen von WORMBOOK.ORG)

Die allgemeine Struktur, Organisation und das Aussehen freilebender *Strongyloides* Weibchen erinnern an *C. elegans* Hermaphrodite. Die infektiösen Larven, die als Analoga zu Dauerlarven freilebender Nematoden gesehen werden [Hotez, et al., 1993], ziehen sich radial zusammen und besitzen eine filariformige Speiseröhre wie *C. elegans* Dauerlarven. Bei *S. stercoralis* wurden durch

Laserablation der amphidialen Neuronen zwei Arten Neuronen identifiziert, die zur Steuerung der weiblichen Entwicklungsentscheidung zur freilebenden Adulte notwendig sind. Diese amphidialen Neuronen wurden auch bei *C. elegans* identifiziert [Ashton, et al., 1995; Ashton, et al., 1998; Ashton and Schad, 1996]. Studien der vermeintlichen homologen Gene *daf-7* parasitärer Nematoden, einschließlich *S. ratti* und *S. Stercoralis*, sprechen allerdings nicht für eine evolutionäre Verwandtschaft von Dauer- und infektiösen Larven [Viney, et al., 2005]: *daf-7*, welches in *C. elegans* hauptsächlich über eine Dauerformation entscheidet [Ren, et al., 1996], hat in analogen Entwicklungsstadien von parasitären Nematoden ein anderes Expressionsmuster [Crook, et al., 2005; Massey, et al., 2005; Viney, et al., 2005].

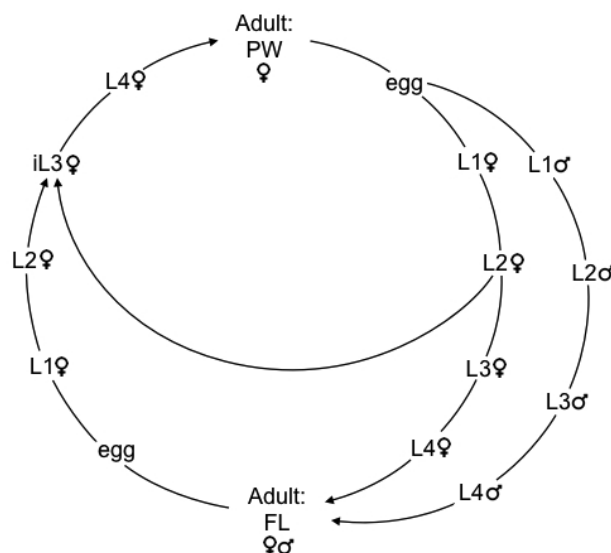


Abb. 1-3 Lebenszyklus von Strongyloides

Infektiöse Larven (iL3), parasitäre Weibchen (PW) und freilebende Adulte (FL). Dieser Lebenszyklus, beschrieben für *S. ratti*, wird in den meisten Strongyloides Spezies beobachtet.

Auf Grund der Schwierigkeiten, die durch NGS gewonnenen kurzen Fragmente zu assemblieren, wurde noch kein ganzes Genom von *S. stercoralis* oder *S. ratti* veröffentlicht. Das Wellcome Trust Sanger Institute führt nun die Sequenzierung der Genome für diese zwei Arten durch. Zur Zeit laufen dafür die Expressed-Sequence-Tag-(EST) sowie die Transkriptom-Analysen [Mitrevva, et al., 2004; Stoltzfus, et al., 2012; Thompson, et al., 2005].

1.4 Der Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans, der "Lieblingswurm der Wissenschaft", verhalf sechs Wissenschaftlern drei Mal zum Nobelpreis. Im Jahr 2002 erhielten der Entwicklungsbiologe Sydney Brenner den Nobelpreis für Medizin und Physiologie zusammen mit John Sulston und Robert Horvitz für ihre Entdeckungen auf dem Gebiet der genetischen Regulierung der Organentwicklung und des programmierten Zelltods. Anschließend wurde der Nobelpreis für Medizin und Physiologie 2006 an Andrew Z. Fire (ein Schüler von Sydney Brenner) und Craig C. Mello für die Erforschung von RNA-Interferenz vergeben. Ihre Arbeiten wurden ebenfalls an *C. elegans* durchgeführt. Der dritte mit *C. elegans* verbundene Nobelpreis ist der Nobelpreis für Chemie 2008, den Martin Chalfie, Osamu Shimomura und Roger Y. Tsien für die Einführung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in die biomedizinische Grundlagenforschung erhielt. Der Biologe Martin Chalfie verwendete GFP in *C. elegans* um die Verteilung eines bestimmten Proteins in Zellen, Geweben und Organismen zu verfolgen. *C. elegans* gehört zur Klade V, Familie Rhabditidae, Gattung *Caenorhabditis*. 1965 wurde die Spezies durch Sydney Brenner in die Wissenschaft als Modellorganismus für Zell- und Entwicklungsbiologie eingeführt. Abb. 1-5 zeigt eine Übersicht der wichtigsten wissenschaftlichen Erkenntnisse über *C. elegans* im 20. Jahrhundert.

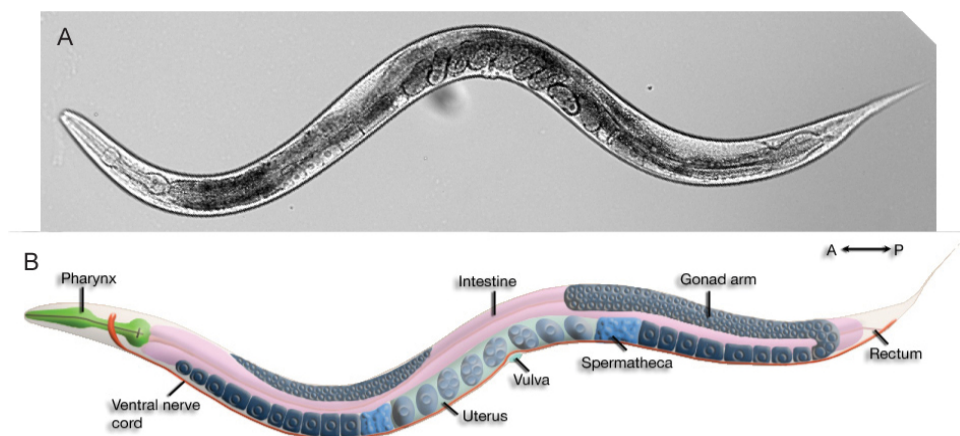


Abb. 1-4 Adulte *C. elegans* Hermaphrodite

A: Echtbild, vom Autor aufgenommen; B: Schematische Darstellung von WORMATLAS.ORG

C. elegans lebt im Boden und ernährt sich dort von Bakterien, Protozoen und Pilzen. Als adultes Tier kann der Wurm eine Länge von etwa einem Millimeter und einen Durchmesser von ca. 65 µm erreichen. Zwei Geschlechtsformen kommen bei *C. elegans* vor, Männchen und Zwitter

(Hermaphroditen). Eine Population besteht hauptsächlich aus Hermaphroditen mit einem Anteil an Männchen von 0,1% bis 0,2% [Corsi, 2006]. Ein adulter Hermaphrodit hat immer genau 959 und ein adultes Männchen 1031 somatische Zellen. Die Linie der somatischen Zellen ist höchst invariant und der entwicklungsbiologische Stammbaum jeder einzelnen somatischen Zelle wurde erstellt [Kimble and Hirsh, 1979; Sulston and Horvitz, 1977].

C. elegans hat eine kurze Generationsdauer, einen kurzen Lebenszyklus (siehe 1.7) und eine große Anzahl an Nachkommen. Selbstbefruchtete Hermaphroditen produzieren etwa 300 Nachkommen [Hodgkin and Barnes, 1991], während die durch Männchen befruchteten Hermaphroditen bis zu 1000 Nachkommen produzieren können.

Das Nervensystem von *C. elegans* ist relativ einfach aufgebaut. Es umfasst beim Hermaphroditen 302 Neuronen sowie 56 Glia- und Stützzellen. Das gesamte Nervensystem wurde mit allen physikalischen Verbindungen im Detail kartiert [Kosinski and Zaremba, 2007; White, et al., 1986] und die basale funktionelle Kommunikation der Netzwerke wurde beschrieben [Watts and Strogatz, 1998]. Zwanzig Neuronen verlaufen um den Pharynx und bilden einen Nervenring, ähnlich einem "Gehirn" des Wurmes. Andere Neuronen bilden die Nervenstränge mit ihren anterior-posterior verlaufenden axonalen Fortsätzen aus. Der dorsale Hauptnervenstrang besteht aus einer Serie von Motoneuronen. *C. elegans* benutzt einige primitive Sinnesorgane in der Kopf- und Schwanzregion als Mechano-, Thermo- und Chemorezeptoren. *C. elegans* besitzt einen vollständigen Verdauungstrakt, der aus dem Pharynx und dem Darm besteht. Der Verdauungstrakt liegt zusammen mit den Gonaden innerhalb des Pseudocoels. Weil *C. elegans* transparent ist, können alle inneren Organe unter dem Mikroskop deutlich betrachtet werden.

Das Genom von *C. elegans* ist relativ klein (siehe 1.5) und Wurmpopulationen sind sehr einfach und kostengünstig unter Laborbedingungen zu züchten. Mit anderen Worten ist *C. elegans* als Modellorganismus einer der einfachsten Vielzeller (Metazoa) mit ausreichend Gewebetypen und Systemen zum Untersuchen. Viele neue Entdeckungen wurden erstmals in *C. elegans* gemacht, zum Beispiel microRNAs. Viele grundlegende Mechanismen sind im Wurm wie auch im Menschen konserviert. Er ist ein verbreitetes Modellsystem für die Erforschung der molekularen Grundlagen vieler Krankheiten. Viele molekularbiologische Methoden im Zusammenhang mit dem Modellorganismus *C. elegans* sind sehr gut entwickelt und bieten den Forschern die Möglichkeit, ihre Hypothese zu untersuchen.

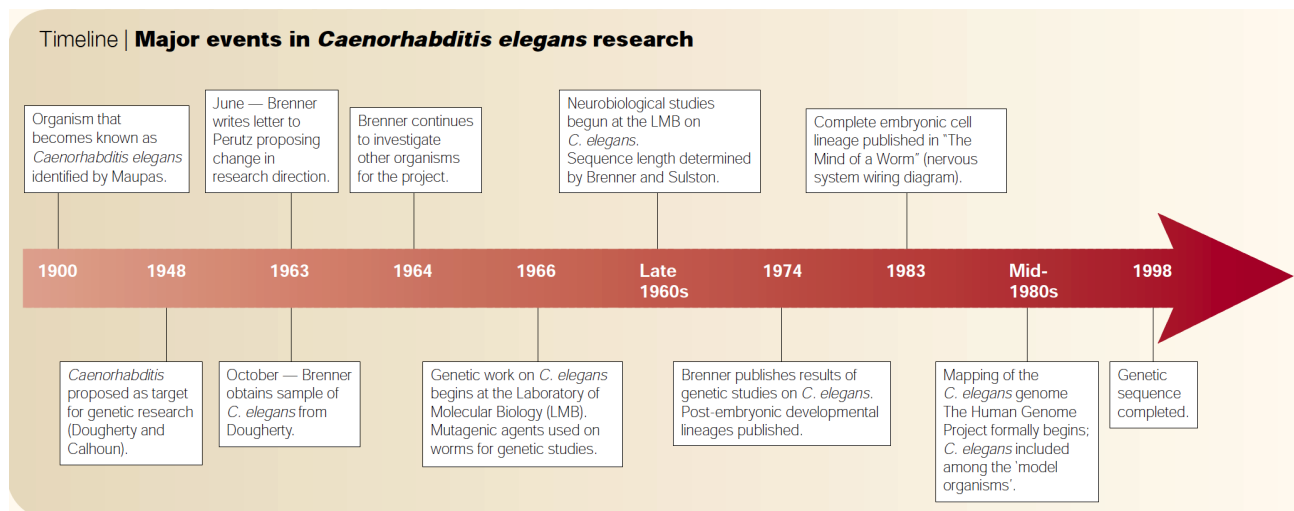


Abb. 1-5 Die wichtigsten wissenschaftlichen Erkenntnisse über *C. elegans* im 20. Jahrhundert

Die Abbildung stammt aus der Publikation von Ankeny (Nature Reviews Genetics June 2001)[Ankeny, 2001]

1.5 *Caenorhabditis briggsae*

C. briggsae ist eine mit *C. elegans* verwandte Nematodenspezies und zu dieser fast identisch in Morphologie und Verhalten. Die beiden Arten haben sich aus einem gemeinsamen Vorfahren vor 80 bis 100 Millionen Jahren entwickelt und sind damit evolutiv gesehen etwa so weit auseinander wie Mensch und Maus, die seit ca. 75 Millionen Jahren getrennte Wege gehen [Stein, et al., 2003]. Während das Erbgut von *C. elegans* als der erste vollständig sequenzierte Vielzeller seit 1998 bekannt ist, wurde das Genom von *C. briggsae* im Jahr 2003 vollständig entschlüsselt [Stein, et al., 2003]. *C. elegans* hat fünf Autosomen und ein X-Chromosom als Geschlechtschromosom. Wenn nur ein X-Chromosom vorhanden ist (X0), ist der Wurm ein Männchen. Sind zwei X Chromosome vorhanden, ist er Hermaphrodit. Das ganze Genom enthält nach dem neuesten Datensatz WS235, welcher am 28.11.2012 veröffentlicht wurde, insgesamt 100.272.607 Basenpaare und 26.207 vorhergesagte Gene, davon 24.038 Gene, die schon durch Experimente teilweise oder komplett identifiziert wurden. *C. briggsae* besitzt genauso viele Chromosomen und dieselbe Form der Geschlechtsbestimmung. 21.961 Gene wurden im *C. briggsae* Genom (108.419.768 bp) in WS235 vorhergesagt. Nur 913 Gene wurden teilweise oder komplett charakterisiert. Die bioinformatische Auswertung der Daten hat allerdings gezeigt, dass 62% der Protein-kodierenden Gene von *C. briggsae* Orthologe in *C. elegans* besitzen [Chen, et al., 2005]. Außerdem existiert eine erhebliche Anzahl von artspezifischen Genen in beiden Genomen [Stein, et al., 2003]. Die identische Morphologie, die genetische

Konservierung und die Divergenz zwischen den beiden Nematodenspezies liefern ein ideales Modell für vergleichende Studien der Evolution.

1.6 Mögliche Zwischenform: *Pristionchus pacificus*

Es gibt in Klade V noch eine weitere gut erforschte Nematodenart, *Pristionchus pacificus*, die zur Familie Diplogasteridae gehört. *P. pacificus* besitzt mit *C. elegans* die letzten gemeinsamen Vorfahren vor etwa 200 bis 300 Millionen Jahren und wurde zur vergleichenden Analyse als Satellitensystem der evolutionären Entwicklungsbiologie etabliert [Hong and Sommer, 2006], z.B. zu Vulva-Bildung, Gonadenentwicklung [Rudel, et al., 2005], Geschlechtsbestimmung [Pires-daSilva and Sommer, 2004] und Mesodermentwicklung [Photos, et al., 2006].

P. pacificus bildet Hermaphrodite mit Selbstbefruchtung und Männchen aus. Die Spezies kann unter Laborbedingungen auf *E. coli* OP50 gezüchtet werden. Der Lebenszyklus beträgt vier Tage bei 20 °C und ist ein bisschen langsamer als der von *C. elegans*. So wie alle Arten der Familie Diplogasteridae weist *P. pacificus* eine embryonale Häutung auf. L1 Larven häuten sich und werden zu L2, bevor sie aus dem Ei schlüpfen [Fürst von Lieven, 2005]. Das L1 Stadium ist deshalb nicht richtig freilebend. Wie bei *C. elegans* induzieren auch bei *P. Pacificus* ungünstige Umweltbedingungen die Bildung von Dauerlarven nach der L1/L2 Häutung.

Das Genus *Pristionchus* wird ökologisch häufig in einer wirtsspezifischen Assoziation mit Skarabäen gefunden. Es kann die spezifischen Signale von Wirten erkennen und als Dauerlarve auf den Käfern überleben. Nach dem Tod der Käfer ernähren sie sich dann von den Mikroorganismen, die während der Verrottung die Kadaver besiedeln. Dieser Lebensstil wird als "Nekromenie" bezeichnet und gilt als unmittelbare Vorstufe zum Parasitismus.

P. pacificus besitzt sechs Chromosomen. Basierend auf dem Vergleich der genetischen Kopplungskarte zeigen die Chromosomen II, III, IV und X gute Homologie zwischen *P. pacificus* und *C. elegans*. Das Chromosom V von *P. pacificus* entspricht dem Chromosom I in *C. elegans*. Aber das Chromosom I von *P. pacificus* enthält nicht nur das Chromosom V von *C. elegans* sondern auch Gene, die ortholog zu denen auf dem X-Chromosom von *C. elegans* sind. Dies bedeutet, dass eine große chromosomale Translokation nach der Auftrennung von *Pristionchus* und *Caenorhabditis* stattfand [Srinivasan, et al., 2002]. Die National Institutes of Health (Nationale Gesundheitsinstitute, NIH) hat 2006 das Genom von *P. pacificus* sequenziert. Es enthält laut Datensatz WS235 insgesamt

172.773.083 Basenpaare und 24.216 vorhergesagte Gene, davon sind 5.211 Gene bereits durch Experimente teilweise oder komplett identifiziert worden.

Obwohl die Chromosomen von *P. pacificus* und *C. elegans* eine Makro-Syntänie (alle auf einem Chromosom liegenden Genloci) besetzen, zeigt der Vergleich viele Unterschiede im genetischen Repertoire beider Arten. Zum Beispiel hat *P. pacificus* viel mehr Cytochrom P450 Enzyme als *C. elegans* und besitzt Cellulase Gene, die normalerweise bei freilebenden Nematoden wie *C. elegans* vollständig abwesend sind [Dieterich, et al., 2008].

1.7 Der Lebenszyklus von freilebenden Nematoden und Dauerlarven

C. elegans und *C. briggsae* wachsen sehr rasch unter standardisierten Laborbedingungen. Das eilegende adulte Stadium wird bei 20 °C nach etwa 3,5 Tagen ab dem Zeitpunkt der Eibefruchtung erreicht. Bei 25 °C verkürzt sich der Lebenszyklus auf etwa drei Tage, bei 15 °C dauert ein Zyklus sechs Tage. Die ersten 150 min der Entwicklung nach der Befruchtung innerhalb des Uterus und ca. 8-9 Stunden der Entwicklung nach der Eiablage bis zum Schlüpfen der L1-Larve werden als Embryogenese bezeichnet (Abb. 1-6) [Corsi, 2006; Riddle, 1988]. Das erste Larvenstadium (L1) schlüpft mit einer Länge von 250 µm und hat beim hermaphroditischen L1 genau 558 Zellen. In den nächsten 40-50 Stunden wird die postembryonale Entwicklung mit drei weiteren Larvenstadien durchlaufen. Nach mehreren Häutungen (360-380 µm bei der L1/L2 Häutung, 490-510 µm bei L2/L3, 620-650 µm bei L3/L4 und 900-940 µm bei L4/Adult) ist das reproduktionsfähige adulte Stadium erreicht. Die gesamte Lebensdauer beträgt bei 20 °C etwa drei Wochen [Byerly, et al., 1976; Sulston, 1988].

Unter ungünstigen Umweltbedingungen, z. B. Nahrungsmangel, große Populationsdichte oder hohe Temperatur, gehen die Würmer nach der L1/L2 Häutung anstelle von L3 in das Larvenstadium „Dauerlarve“ über. In diesem alternativen Stadium kann die Larve sich zwar aktiv bewegen, frisst jedoch nicht, zeigt sich sehr resistent gegenüber Stress und altert nicht. So kann diese etwas dünnere Dauerlarve bis zu einigen Monaten unbeschadet überleben [Riddle, 1988]. Unter verbesserten Umweltbedingungen, z.B. im Labor nach Umsetzen in frisches Medium mit ausreichender Nahrung, beginnt die Dauerlarve nach 1-2 Stunden wieder zu fressen. Nach weiteren 8-10 Stunden häutet sich die Post-Dauerlarve zu einer L4 Larve, die sich dann normal weiterentwickelt [Cassada and Russell, 1975].

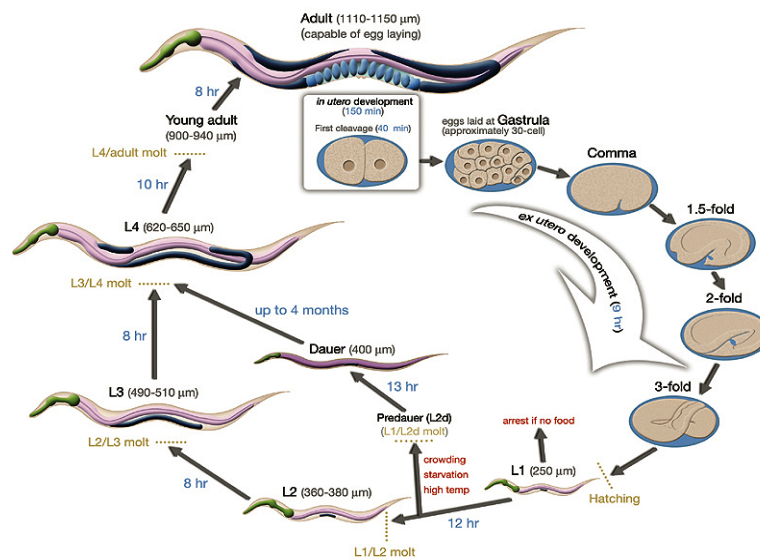


Abb. 1-6 Lebenszyklus von *C. elegans* bei 22 °C

Abbildung von WORMATLAS.ORG

Bei der Dauerlarve verändert sich der Körperbauplan, um deren Bedürfnisse zu befriedigen. Der unsegmentierte, zylindrische Körper besteht aus zwei konzentrischen Röhren, der Körperwand und dem Darm. Der flüssigkeitsgefüllte Raum dazwischen wird als Pseudocoelom bezeichnet, da dieser Hohlraum nicht komplett mit Mesoderm ausgekleidet wird. Die Körperwand besteht aus einer widerstandsfähigen Oberhaut (Kutikula), der Hypodermis sowie Muskeln und Nervenzellen [Lorenzen, 2007; Wood, 1988]. Eine Basalmembran liegt zwischen Hypodermis und Muskulatur. Die Gonaden befinden sich beim Adulten im Pseudocoelom [Wood, 1988].

Kutikula in der Körperwand

Die transparente Kutikula ist eine extrazelluläre Schicht, die von der Hypodermis produziert wird. Sie umfasst von außen nach innen Epikutikula, Kortex-, Median- und Basalschicht. Die Epikutikula wird durch ein Protein ähnlich dem Keratin aufgebaut. Die Kortexschicht besteht aus Kollagen. Die Medianschicht ist ein flüssigkeitsgefüllter Raum, der Verbindungen aus Kollagen („Strut“ auf Abb. 1-7) zur Kortexschicht enthält. Die Basalschicht ist aus einer amorphen und zwei fibrillären Kollagenschichten zusammengesetzt [Cox, et al., 1981a; Cox, et al., 1981b].

Die Kutikula wird hauptsächlich vor jeder Häutung neu synthetisiert, kann aber auf Grund dynamischen Stoffwechsels auch ohne Häutung wachsen [Lorenzen, 2007]. *C. elegans* bildet je nach

Entwicklungsstadium vier spezifische Typen der Kutikula aus, die L1-, Dauer-, L4- und Adult-Typen [Cox, et al., 1981c; Cox, et al., 1981b; Lorenzen, 2007]. Im Vergleich zu der Kutikula beim adultes Tier besitzt die Dauerlarve eine verdickte Epikutikula. Durch Konvergenz bilden die Fibrillen ihrer Basalschicht eine stark gestreifte Zone.

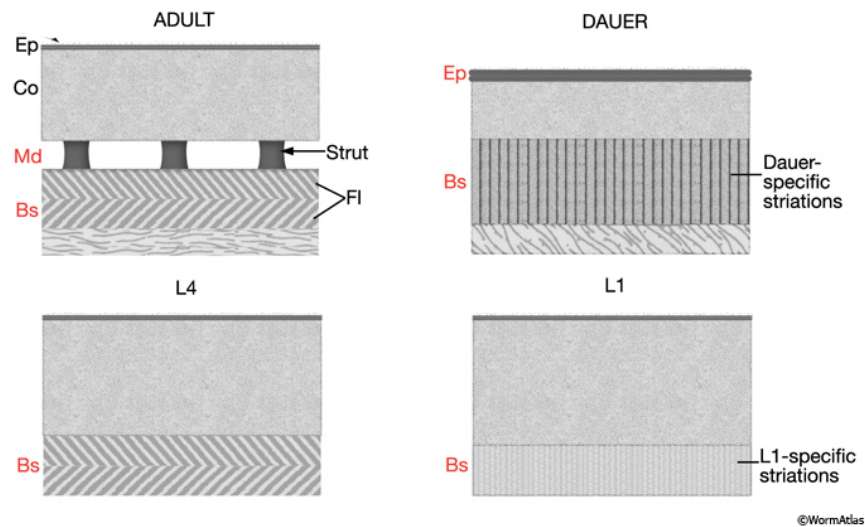


Abb. 1-7 Die spezifische Struktur der Kutikula für verschiedene Entwicklungsstadien

Ep: Epikutikula, Co: Kortexschicht, Md: Medianschicht, Bs: Basalschicht, Strut: Kollagenverbindungen, Fl: fibrilläre Schicht. Abbildungen von WORMATLAS.ORG

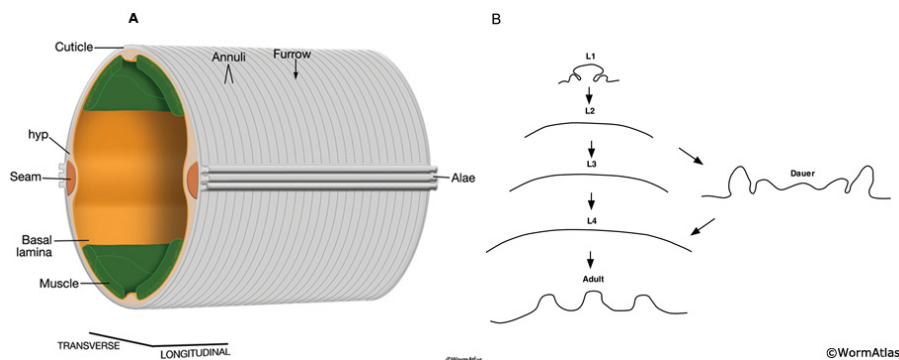


Abb. 1-8 Die Fortsätze der Kutikula

A: Annuli und Alae, B: Alae für verschiedene Entwicklungsstadien. Abbildungen von WORMATLAS.ORG

Die Kutikula schützt die gesamte Körperoberfläche und bedeckt auch Mund, Pharynx, Vulva, Rektum und Anus. Sie ist je nach Funktion in verschiedenen Körperregionen und Entwicklungs-

stadien chemisch und strukturell verschieden aufgebaut. Auf der Körperoberfläche gestaltet die Kutikula die regelmäßigen umlaufenden Umfangsrippen, so genannte Annuli (Abb. 1-8). Im L1-, im Dauer- und im Adultstadium besitzt *C. elegans* über die ganze Körperlänge zwei laterale Kutikularfortsätze, die Alae. Diese beiden Strukturen sind *C. elegans* bei der Fortbewegung auf festen Medien behilflich.

Verdauungstrakte in Dauerlarven

Es ist sinnvoll für Dauerlarven, die beiden Mündungen des Verdauungstraktes zu schließen, um den Körper vor dem Austrocknen zu schützen. Nematoden gehören zu den Vielzellern (Metazoa), Bilateria, Urmündern (Protostomia) und Häutungstieren (Ecdysozoa). Ihr Mund ist die ursprüngliche Öffnung des Urdamms in der Gastrula. Die Mundöffnung ist von sechs radial liegenden Lippen umrundet. Die Mundhöhle (engl. *buccal cavity*) ist in Cheilostom, Prostom, Mesostom und Telostom gegliedert. Die Kutikula der Körperwand erstreckt sich auf dem Cheilostom. Die Zellen der Mundhöhle produzieren die Kutikula auf Prostom, Mesostom und Telostom. Zwischen Mesostom und Telostom bestehen drei Mesostomklappen (Flaps). Die Mundhöhle wird bei der Dauerlarve durch einen Pfropf (Plug) verschlossen, der aus der Kutikula der Körperwand entsteht. Die Mesostomklappen wachsen bei Dauerlarven ähnlich wie bei L3 und sind kleiner als die von adulten Tieren.

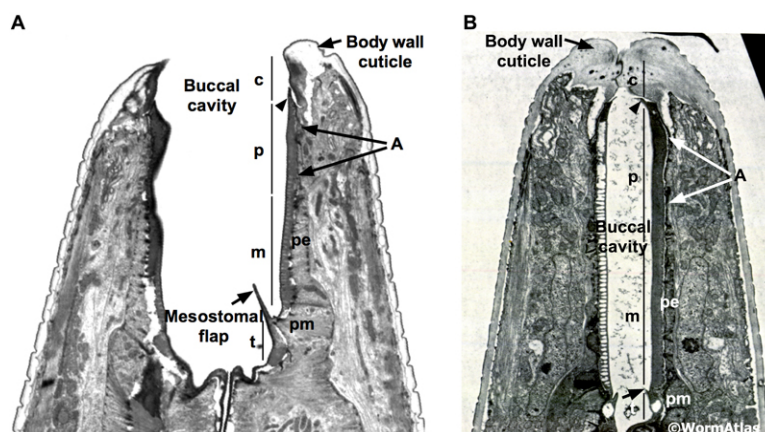


Abb. 1-9 Mundhöhle von *C. elegans* Adult (A) und Dauerlarven (B)

c: Cheilostom p: Prostom m: Mesostom t: Telostom. Abbildung von WORMATLAS.ORG

Der Pharynx wird hinter der Mundhöhle in vier Abschnitte aufgeteilt: den Procorpus, den birnenförmigen Metacarpus, den zylindrischen Isthmus und den Terminalbulbus. Drei symmetrisch

angeordnete Muskelzellen bilden das Zentrallumen, in dem die Strukturen "Sieve" (Sieb) und "Grinder" (Mühle) aus Kutikula existieren. Durch ständige Pumpbewegungen des Pharynx nimmt der Wurm Bakterien in die Mundhöhle und dann in den Corpus auf. Die Nahrung wird durch das Sieve filtriert. Isthmus und Terminalbulbus zerquetschen die Nahrung und pumpen sie in den Darm weiter. Die Grinder funktionieren hier als Klappen [Albertson and Thomson, 1976; Franks, et al., 2006].

In der Dauerlarve schrumpft der gesamte Pharynx, insbesondere die Pharyngeal-Epithelzellen, Marginalzellen, Muskelzellen und Drüsenzellen. Im Gegensatz dazu verändern sich die neuronalen Strukturen nicht signifikant im Vergleich zum Adulten. Die Pumpbewegung hört bei der Dauerlarve auf. Der Stillstand der Pumpbewegung kann Energie sparen und vor Beschädigungen durch unnötige Muskelkontraktion schützen [Chow, et al., 2006]. Durch den Kontakt mit Nahrung erholt sich der Wurm vom Dauerstadium und nach durchschnittlich 2 Stunden wird die Pumpbewegung reinitiiert [Golden and Riddle, 1984].

Die Exkretionsorgane Anus (Exkretionspore, EP) und Rektum sind sekundäre Öffnungen, die sich am entgegengesetzten Ende der Gastrula bilden und mit Kutikula ausgekleidet sind. Im Dauerstadium ist die Kutikula vom Anus verdickt. Anus und Rektum sind jedoch nicht wie die Mundöffnung geschlossen. In Dauerlarven wurden auch Pulsationen des Exkretionsgangs beobachtet. Vermutlich ist das Exkretionssystem in Dauerlarven noch aktiv [Nelson, et al., 1983].

Das spezifische Verhalten von Dauerlarven

Die Ausrüstung der Dauerlarve verschafft dem Wurm eine Resistenz gegenüber Detergenzlösungen, wie z.B. 1% SDS für bis zu einer Stunde [Swanson and Riddle, 1981]. Dauerlarven unterscheiden sich nicht nur im Körperbauplan signifikant von anderen Entwicklungsstadien, sie zeigen auch ein eigenes, spezifisches Verhalten.

Dauerlarven besitzen eine positive Chemotaxis zu Kohlenstoffdioxid (CO_2) und keine Taxis zu Natrium-Ionen (Na^+), während andere Entwicklungsstadien eine negative Chemotaxis zu CO_2 und eine positive zu Na^+ aufweisen [Albert and Riddle, 1983; Bretscher, et al., 2008; Cassada and Russell, 1975; Hallem, et al., 2011; Hallem and Sternberg, 2008; Ward, 1973].

Ohne äußere Einflüsse bleiben Dauerlarven unbeweglich [Cassada and Russell, 1975; Gaglia and Kenyon, 2009] und die Pharynxpumpe stoppt, so wie im Lethargus Zustand innerhalb einer

Häutung [Cassada and Russell, 1975]. Dennoch können sie durch mechanische Reize sofort zur Bewegung stimuliert werden und fliehen [Cassada and Russell, 1975]. Dies deutet darauf hin, dass die Muskeln von Dauerlarven noch voll funktionsfähig sind.

Dauerlarven besitzen ein einzigartiges Verhalten, das als Niktation bezeichnet wird (Abb. 1-10): Manchmal stehen sie aufrecht, mit ihren Schwanzenden auf dem Untergrund, und schwanken in der Luft [Cassada and Russell, 1975]. Niktation wurde spezifisch bei Dauerlarven beobachtet und kann mittels mechanischer Stimulation oder Photostimulation durch elektrische Lichter induziert werden [Staniland, 1957]. Ein ähnliches Verhalten ist auch bei infektiösen Larven parasitärer Nematoden gefunden worden [Campbell and Gaugler, 1993; Campbell and Kaya, 1999; Hallem, et al., 2011; Huey and Pianka, 1981].

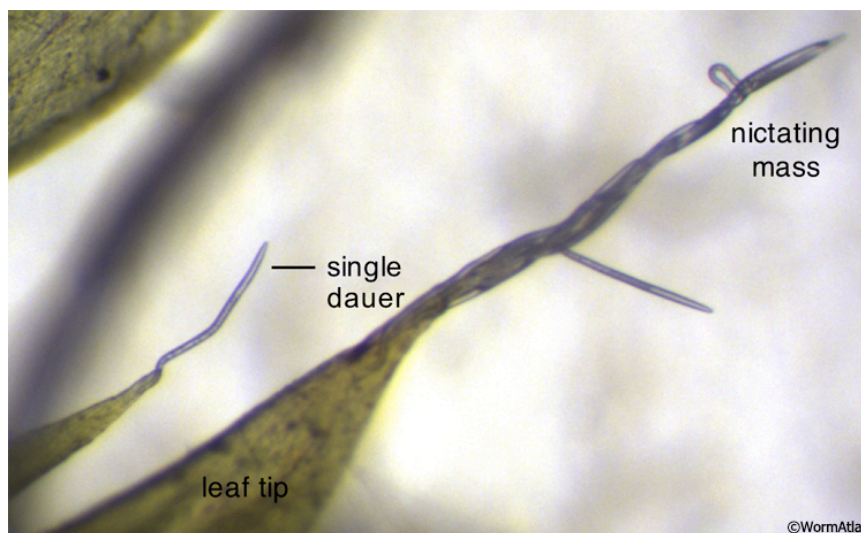


Abb. 1-10: Niktation bei *C. elegans* Dauerlarven

Abbildung von WORMATLAS.ORG

Neben dem Dauerlarvenstadium existiert noch die Entwicklungshemmung in anderen Entwicklungsstadien. Allerdings können außer der Dauerlarve nur „arrested“ L1-Larven ca. drei Wochen überleben. Andere „arrested“ Stadien verhungern nach einigen Tagen [Ruaud and Bessereau, 2006; Seidel and Kimble, 2011].

Transkriptom-Studien in Dauerlarven

Mittels Hochdurchsatz-Technologien wurde die Genexpression im Transkriptom von *C. elegans* Dauerlarven erforscht. Im Jahr 2001 wurde erstmals die serielle Analyse der Genexpression (SAGE, engl. *Serial Analysis of Gene Expression*) in Transkriptom-Studien eingesetzt [Jones, et al., 2001]. Seit 2003 wurden Studien der Genexpression in Dauerlarven mit High-Density-Microarrays durchgeführt [Wang and Kim, 2003]. Wir begannen im Jahr 2009, die modernen Hochdurchsatz-Technologien RNA-seq für die Transkriptom- sowie LC-MS/MS basierte Shotgun Methoden für die Proteom-Analyse einzusetzen. Sämtliche Verfahren von der Datenerfassung bis zur Analyse von Transkriptom und Proteom der Nematoden wurden erfolgreich von uns etabliert.

2. Materialien und Methoden

2.1 Methoden

2.1.1 Wurmstämme und Kultivierung

Wir verwendeten für das Projekt die Wildtypstämme von *C. elegans* (N2), *C. briggsae* (AF16) und *P. pacificus* (RS2333, ehemals PS312) sowie einen *umps-1* Knockout-Stamm von *C. elegans* (GH626). Alle Stämme wurden bei 22°C auf Standard NGM-Platten kultiviert, sofern nicht anders angegeben. Flüssige Wurmulturen wurden stets mit synchronisierten L1-Larven angesetzt. Die Eier wurden durch so genanntes "Bleaching" von Wurmplatten isoliert und schlüpften über Nacht in M9 Puffer [Stiernagle, 2006]. Die Proben von *S. ratti* stammen aus dem Labor von PD Dr. Norbert W. Brattig in Hamburg.

2.1.1.1 Eier Präparation durch Bleaching

Zum Entfernen von Kontaminationen und Synchronisieren der Wurmkultur werden Eier aus graviden Hermaphroditen durch Bleaching präpariert: Würmer und Eier werden mit M9 Puffer von den Platten abgespült, ein Mal zentrifugiert und in sterilem Wasser resuspendiert. Die Bleich-Mischung aus Natriumhypochlorit (NaOCl, 5% Cl) und 5 M NaOH wird im Verhältnis 2:1 frisch angesetzt. Diese Bleiche wird mit der Wurm-Ei-Wassersuspension im Verhältnis 3:7 gemischt, dabei sollte das Gesamtvolumen mindestens zehn Mal so groß wie das ursprüngliche Wurm-Ei-Pellet sein (Beispiel: 100 µl Pellet + 6,9 ml Wasser + 3 ml Bleiche). Die Mischung wird im Zentrifugenröhrchen über 10 Minuten hinweg alle 2 min kräftig geschüttelt oder gevortext. Anschließend werden die Eier für 30 Sekunden in der Zentrifuge bei 1.300 g pelletiert und insgesamt drei Mal mit sterilem M9 Puffer gewaschen.

2.1.1.2 Nicht-dauer Mix und Dauerkultur

Flüssige nicht-Dauerkulturen wurden durch Animpfen von 500 ml S-Medium mit 100 L1 Larven angesetzt. Am vierten Tag wurde 25S-Δ7-Dafachronsäure zu einer Endkonzentration von 26 nM zugegeben, um die Dauerformation zu unterdrücken. Flüssige Dauerkulturen wurden mit ca. 300.000 L1 Larven in 300 ml S-Medium initiiert. Antibiotic-Antimycotic wurde in der Kultur 1:100 verdünnt, um die Kontamination durch Pilze und Bakterien zu verhindern. Nicht-Dauerkulturen wurden am 1., 4. und 7. Tag jeweils mit 0,5 g OP50 (oder anderen Bakterien) Pellet pro 100 ml Kultur gefüttert und am 8. Tag mit einer Konzentration von ca. 5.000 Wurmern pro Milliliter geerntet. Dauerkulturen wurden am 1., 2., 3., 6. und 7. Tag mit der gleichen Menge an Bakterien

gefüttert und am 12. Tag geerntet. Durch visuelle Inspektion wurde ermittelt, dass mehr als 90% der Würmer Dauerlarven waren. Der nicht-Dauer Mix wurde bei der Ernte mit M9-Puffer gewaschen und durch Saccharose-Flotation (siehe 2.1.2.1) zusätzlich von toten und Dauerlaven gereinigt.

2.1.1.3 Zeitreihen Experiment für Daueraustritt

Die aufgereinigten Dauerlarven wurden über Nacht zur Regeneration im alten Kulturmedium, das durch einen Filter mit einer Porenweite von 0,2 μm aufbereitet wurde, inkubiert. Der Daueraustritt wurde auf jeder NGM-Platte ($\varnothing 10\text{cm}$, 150 mg *E. coli*) mit 3.000-5.000 Würmern durchgeführt. Die Proben wurden bei 22 °C nach 1, 2, 4, 8 und 16 Stunden gesammelt, die 0 h Probe wurde direkt präpariert. Alle Wurmproben wurden mehrmals mit M9 Puffer gewaschen und für 3 min bei 1.300 g pelletiert.

2.1.2 Präparation und Aufreinigung der Würmer

2.1.2.1 Saccharose-Flotation

Durch Saccharose-Flotation werden lebende Würmer von Schmutz und toten Würmern abgetrennt: Nach dem M9-Waschen wird das Wurmpellet in 7 ml M9-Puffer in einem 15 ml Tube resuspendiert, mit 7 ml 60% Saccharose-Lösung versetzt und gut gemischt. Die Mischung wird für 1 min bei 50 g und dann sofort für 3 min bei 1.150 g zentrifugiert. Schmutz und tote Würmer setzen sich am Boden ab. Die lebenden Würmer schwimmen in der Mischung und obenauf bildet sich eine braune Schicht von Dauerlarven. Mit der Pasteur Pipette wird die braune Schicht so schnell wie möglich in ein neues Tube überführt, drei Mal mit M9 gewaschen und jeweils 3 min bei 1.650 g zentrifugiert. Dieses Pellet enthält viele saubere Dauerlarven im Vergleich zu einer Probe der Flüssigkultur.

2.1.2.2 Aufreinigung der Dauerlarven

Zur Initiierung des Daueraustritts reiner Dauerlarven wurde eine Aufreinigung mit 1% SDS-Lösung und anschließend Saccharose- und Ficoll-Flotation durchgeführt. Das Dauer-Wurmpellet wurde in M9 Puffer resuspendiert, mit gleicher Menge 2% SDS-Lösung gemischt und 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Würmer drei Mal mit M9 Puffer gewaschen und durch Saccharose-Flotation aufgereinigt. Für eine bessere Aufreinigung (z.B. das Entfernen von Kadavern), wurde 15%ige Ficoll Lösung verwendet. Ein Volumen resuspendierter Würmer wurde mit zwei Volumen 15%igem Ficoll gemischt. Durch die Zentrifugation bei 300 g für 10 min pelletierten alle lebende Dauerlarven, die anschließend noch drei Mal mit M9 gewaschen wurden.

2.1.3 pSILAC (engl. *pulsed stable isotope labeling by amino acids in cell culture*)

Beim SILAC-Experiment werden Proteine durch den metabolischen Einbau von stabilen, nicht-radioaktiven Aminosäure-Isotopen markiert. Durch eine Peak-Verschiebung im Massenspektrum von Oligo-Peptiden kann eine akkurate Identifikation von Peptiden und Proteinen und somit die relative Proteinquantifizierung eingesetzt werden. Die klassische SILAC benötigt eine lange und vollständige Markierung der Objekte *in vivo* [Ong, et al., 2002]. pSILAC ist eine Variante, bei der die Objekte im Wachstumsmedium nur für einen kurzen Zeitraum mit der markierten Aminosäure inkubiert werden. Dies ermöglicht eine Detektion der *de novo* Proteinsynthese durch Auswertung der Signalintensitäten von unmarkierten (leichten) und markierten (schweren) Aminosäuren [Schwanhausser, et al., 2009].

Wir haben die markierten Aminosäuren Arginin (Arg10) und Lysin (Lys8) verwendet und eine Vorwärts-pSILAC (leicht zu schwer) durchgeführt. In den Flüssigkulturen wurden die leichten Bakterien zum Anzüchten und dann zur Dauer-Induzierung zugegeben. Der Daueraustritt wurde auf peptonfreien NGM Platten mit schweren Bakterien durchgeführt. Die Durchführung auf Platten verlief wie das label-freie Zeitreihen-Experiment.

Zur Markierung der Bakterien mit schwerem Arginin und Lysin haben wir den Arginin- und Lysin-auxotrophen *E. coli* Stamm AT713 verwendet. Wir überimpften einzelne Kolonien von AT713 in einige ml schweres Dropout-Wachstumsmedium und setzten über Nacht bei 37°C eine Vorkultur an. Die Hauptkultur wuchs bei 220 rpm und 37°C im schweren Dropout-Wachstumsmedium auf einem Schüttler, bis die optische Dichte der Kultur bei 600 nm (OD600) 1,2 oder mehr erreichte. Die Bakterien wurden durch die Zentrifugation bei 3.000 g für 20 min pelletiert, in M9 Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.1.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Würmern

Würmer wurden entweder durch M9 Puffer von Platten ab gespült oder aus Flüssigkulturen in 15 ml Zentrifugenröhrchen aliquotiert. Das Röhrchen stand ein paar Minuten auf Eis. Bei 1.300 g und 4°C wurden die Wurmproben 2-3 min herunterzentrifugiert. Dann wurde zwei bis vier Mal mit kaltem M9 Puffer gewaschen. Wir lysierten das Wurmpellet mit mindestens 10 Volumen kaltem Trizol und überführten je 1 ml in 2 ml-MicroTubes mit ca. 400 µl Glasbeads. Im Homogenisator wurde die Probe für 2 x 10 sec bei 6.000 rpm aufgeschlossen. Die festen Bestandteile wurden 5 min bei 14.000 g

abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 200 µl Chloroform zugegeben und für 30 sec per Hand kräftig geschüttelt. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei 4°C und 14.000 g 15 min zentrifugiert. Der Überstand (die wässrige Phase) wurde in ein neues RNase-freies Tube überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und mehrfach invertiert. Falls weniger als 5 µg/ml RNA erwartet wurden, wurde 1 µg Glykogen zugegeben. Die Präzipitation der RNA wurde für 30 min bei -80°C oder über Nacht bei -20°C durchgeführt. Anschließend wurde die RNA für 30 min bei 4°C und 14.000 g pelletiert. Das Pellet wurde mit 1 ml kaltem, 80%igen EtOH gewaschen und bei 7.500 g und 4°C für 10 min erneut zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Ethanols wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in 30-100 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die Konzentration und Qualität wurde zuerst mittels Spektrophotometrie in einem NanoDrop 1000 bestimmt. Das Verhältnis OD₂₆₀/280 nm sollte größergleich 2,0 sein. Danach wurde die RNA-Integrität mit dem Agilent Bioanalyzer und einem RNA 6000 Nano Chip getestet. Alle Chemikalien und Reagenzien müssen RNase-frei sein.

2.1.5 Präparation der Libraries für RNA-seq

RNA-seq ist eine High-Throughput Sequenziermethode der nächsten Generation. Damit werden die cDNA-Fragment-Libraries, die aus mRNA durch reverse Transkription synthetisiert werden, sequenziert. RNA-Seq weist viele Vorteile gegenüber anderen Methoden auf. So hilft es beispielsweise dabei, komplexe Transkriptome zu erstellen, Exons zu identifizieren oder Genexpression zu quantifizieren, die in der messenger-RNA geschrieben sind.

Wir maßen die Gesamt-RNA-Konzentration mit dem Qubit Fluorometer v2.0 und dem zugehörigen RNA-Assay Kit. Wir benutzten 1 µg Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial für die Libraries. Alle Libraries wurden mittels „TruSeq RNA Sample Preparation Kit“ präpariert und anschließend auf einem Illumina HiSeq 2000 Gerät sequenziert.

2.1.6 Protein Präparation und Shotgun Proteomik

Zur Identifikation und Quantifizierung der Proteine haben wir LC-MS/MS- (Liquid-Chromatographie-Tandem-Massenspektrometrie) basierte Shotgun Proteomik durchgeführt. Für die Proteom-Analyse wurden 100 µl Wurmpellet in Harnstoff-Lysepuffer resuspendiert und 100 µl

Zirkoniumbeads wurden zugegeben. Dann wurden die Proben mit dem Homogenisator zwei mal für 10 sec bei 6.000 rpm geschüttelt. Beads und Zellreste wurden durch Zentrifugation bei 14.000 g für 5 min abgetrennt. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford Assay bestimmt. Die Disulfidbrücken von Proteinen wurden in DTT (2 mM) für 30 min bei 25 °C reduziert und die freien Cysteine wurden in Iodacetamid (11 mM) für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln alkylisiert. 100 µg Protein wurden dann bei 25 °C mit 2,5 µg LysC für 18 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Verdauung durch LysC wurden die Proben dreifach mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat verdünnt. 7 µl immobilisiertes Trypsin wurden hinzugefügt und die Proben wurden für 4 h bei 30 °C rotierend inkubiert.

18 µg dieser Peptidmischung wurden mit STAGE-Tips [Rappsilber, et al., 2003] entsalzt, die Eluate getrocknet und in 20 µl 0,5% Essigsäure in Wasser resuspendiert. Jede Probe wurde mindestens doppelt analysiert. 5 µl Probe wurde ins LC-MS/MS System (Eksigent nanoLC ultra-1D+, Eksigent und LTQ-Orbitrap Velos, Thermo) eingespritzt, mit einem 240-Minuten-Gradienten im Bereich von 5% bis 45% Lösung B (80% Acetonitril, 0,1% Methansäure; Lösung A = 5% Acetonitril, 0,1% Methansäure). Zur chromatographischen Trennung wurde eine 40 cm lange Kapillare (Innendurchmesser 75 µm) mit 3 µm C18-Beads aufgefüllt. An einem Ende der Kapillare wurde die Nanospray-Spitze durch einen Laser-Abzieher hergestellt. Die Nanospray-Quelle wurde von einer Spray-Spannung von 1,9 kV und einer Temperatur des Ionentransfersrohrs von 260°C betrieben. Bei der Tandem-Massenspektrometrie wurden nach einem MS-Übersichtsscan im Orbitrap Massenanalysator (60.000 Auflösung bei 400 m/z) bis zu 20 MS/MS-Scans für die intensivsten Ionen im so genannten datenabhängigen Erfassungsmodus (engl. data-dependent acquisition mode) in der Ionenfalle erstellt. Sobald die Ionen für die Fragmentierung ausgewählt wurden, war die weitere Auswahl für 40 Sekunden gesperrt, um die Ereignisse der neuen Analyse anzunehmen.

Die Fraktionierung der Peptide vor der LC-MS/MS Analyse ist optional, aber sie erhöht die Identifikation der Proteine. Dafür wurden 500 µg verdaute Proben laut Benutzeranweisung auf Empore Cartridges (3M) geladen und mit 70% Acetonitril eluiert. Nach dem Verdampfen von Acetonitril wurden die Peptide nach der Beschreibung von Adamidi [Adamidi, et al., 2011] durch isoelektrische Fokussierung auf dem Mikrorotofor fraktioniert. Kurz darauf wurden die Peptide mit Milli-Q Wasser auf ein Gesamtvolumen von 2,5 ml verdünnt und es wurden 150 µl Ampholit-Lösung (40% w/w) zugegeben. Nach 3 h Fokussierung gemäß Benutzeranweisung wurden 10

Fractionen für jede Probe eingesammelt und mit zwei oder drei Stage-Tips entsalzt. Die Eluate wurden getrocknet und in 20 µl 0,5% Essigsäure resuspendiert.

2.1.7 Real-Time-quantitative-PCR (qPCR)

Zur Überprüfung der mRNA-seq Ergebnisse haben wir die Genexpression für ein paar Kandidatengene erneut durch qPCR bestimmt. Zuerst wurde die isolierte Gesamt-RNA durch Dnase I kurz behandelt und die reverse Transkription wurde mit dem Kit „SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ durchgeführt. Hier wurde Oligo (dT) zur Umschreibung der 2 µg mRNA zu cDNA als RT-Primer verwendet. 20 µl Reaktionsvolumen wurden für jede qPCR-Reaktion angesetzt (10 µl 2x SybrGreen Master Mix, 0,5 µl 10 µM Vorwärtsprimer, 0,5 µl 10 µM Rückwärtsprimer, 1 µl cDNA und 8 µl nukleasefreies Wasser) und drei oder vier technische Replikate wurden angefertigt. Im „StepOnePlus Real-Time PCR System“ wurde das qPCR-Programm (50 °C 2 min, 95 °C 10 min, (95 °C 15 sec, 60 °C 1 min) 40 Zyklen, Ausgangstemperatur der Schmelzkurve 60 °C) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels StepOnePlus Software V2.1 ausgewertet.

2.1.8 Zählung durch Biosorter und Extraktion von Gesamt-RNA und Gesamt-Protein

C.elegans N2 gereinigte Dauerlarven wurden zwei Mal mit M9 Buffer gewaschen und in M9 resuspendiert, um sie auf die optimale Flussrate von ca. zehn Würmern pro min im BioSorter zu verdünnen (alternativ bis zu 5 Würmer/min). Die Parameter "coincidence mode" von BioSorter wurden auf "Pure" eingestellt. So sortierte die Maschine einen Wurm aus, wenn nur ein einzelner, kompletter Wurm im Fenster der Flow-cell erkannt wurde. Für die Gesamt-RNA und Gesamt-Protein Analyse nahmen wir jeweils vier technische Replikate, die jeweils genau 3.000 Würmer enthielten. Die sortierten Proben standen auf Eis und wurden nach zwei Mal Waschen mit M9 durch Zentrifugation pelletiert. Die Pellets wurden für die RNA Präparation in Trizol resuspendiert und homogenisiert und für die Protein Präparation in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Extraktion der Gesamt-RNA wurde wie in 2.1.4 durchgeführt. Um so effizient und genau wie möglich die Gesamt-RNA zu isolieren, wurden einige Schritten modifiziert. Die Wurmpellets wurden so zwei Mal homogenisiert. Durch Verwendung Phase-lock Tubes kann die Wasserphase von der Interphase und der organischen Phase komplett aufgetrennt und abpipettiert werden. Mit

Hilfe von Glykogen wurde die RNA effizient präzipitiert. Die RNA Pellets wurden in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

Zur Extraktion von Gesamt-Protein wurden 500 µl 4% SDS-Lösung auf die eingefroren Pellets gegeben. Dann wurden die Tubes mit ddH₂O auf 1.000 µl aufgefüllt. Die Proben wurden bei 99°C für 20 min gekocht und auf Eis kurz abgekühlt. Die Würmer wurden durch das Aufziehen und Abgeben mittels Spritze durch eine 21G- und eine 26G-Nadel (je 6 Mal) aufgeschlossen. Zum Zerlegen der DNA-Moleküle wurden die Proben für 90 sec mit den Parametern "Power" 80% und "Cycles" 2 durch Ultraschall-Homogenisator (SONOPULS HD 2070) beschallt. Danach wurden sie bei 4 °C und 4500 g für 90 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Tube überführt.

Die Konzentrationsbestimmungen wurden mittels Qubit und den entsprechenden Kits für RNA und Proteine durchgeführt. Für jede Probe haben wir drei technische Replikaten gemessen.

2.1.9 Protein occupancy profiling of mRNA (popomR)

Umps-1 Knockout *C. elegans* Stamm GH626 wurde 60 h von L1 bis zum frühen adulten Stadium in Flüssigkultur mit 2 mM 4SU aufgezüchtet. Die markierten Würmer wurden mit M9 Puffer abgespült und auf kalten, bakterienfreien NGM Platten gleichmäßig in einer Schicht verteilt. Zum UV-Crosslinking wurden die Platten im Stratalinker 2400 (Stratagene) auf Eis mit 365 nm UV-Licht (3 J/cm²) bestrahlt. Zwischendurch wurde mehrmals M9 Puffer zugegeben, um die Platten und Würmer feuchtzuhalten. Dann spülten wir die Würmer ab und resuspendierten auf Eis die Pellets in zehn Volumen Lyse-/Bindungspuffer. Anschließend wurden die Würmer für 20-30 min mittels eines Douncers auf Eis homogenisiert, bis alle Wurmkörper zerlegt und lysiert waren. Oligo(dT) Beads wurden durch Waschen in Lyse-/Bindungspuffer vorbereitet. 50 µl Beads (Bettvolumen) sind notwendig, um 1 mg Gesamt-RNA durch "Pulldown" in Lyse-/Bindungspuffer zu erhalten. Die Beads und die Lysate wurden 1:1 gemischt und 1 h bei RT auf einem Rotator inkubiert. Der Überstand wurde durch den magnetischen Ständer entfernt und die Proben standen für mehrere Runden der mRNA-Hybridisierung auf Eis: die Beads wurden drei Mal in ein Lysatvolumen Lyse-/Bindungspuffer gewaschen und dann drei Mal in ein Lysatvolumen NP40-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Beads im gewünschten Volumen Elutionspuffer resuspendiert und in ein neues 1,5 ml Tube überführt. Die hybridisierten polyA-mRNAs wurden bei 80 °C für 2

min eluiert und die Eluate danach sofort auf Eis gestellt. Dieselben Lysate wurde insgesamt drei Mal wie beschrieben mit den Beads eluiert. Die Eluate aus den drei Runden wurden vereint und mittels Silberfärbung getestet.

Die eluierten Protein-RNA-Komplexe wurden mittels RNase I verdaut und durch Zugabe von Ammoniumsulfat präzipitiert, dann durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die RNA-Fragmente wurden aus der Membran durch Proteinase-K-Behandlung eluiert und mittels Phenol/Chloroform extrahiert. Die RNAs wurden dann mit CIP dephosphoryliert und danach noch ein Mal mittels Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol präzipitiert. Die 5' Enden wurden durch T4 PNK mit ^{32}P markiert. Die radioaktiv markierten RNAs wurden extrahiert und anschließend wurden die Adapter-Ligation und Präparation der Bibliothek zur Sequenzierung durchgeführt, wie bereits beschrieben [Hafner, et al., 2010].

2.1.10 Silberfärbung

30-50 μl Protein-RNA-Komplexe wurden bei 37° C für 2 h mit 1 μl RNase I verdaut. Dann wurden die Proben mit 6x SDS-PAGE Farbstoff gemischt und für 5-10 min bei 95 °C gekocht. Nach der 12% SDS-PA-Gelelektrophorese wurde das Gel für 1 h in der Fixierungslösung und dann für 1 h bis über Nacht bei RT in der Inkubationslösung inkubiert. Es wurde drei Mal für 10 min mit ddH₂O gewaschen. In der Färbelösung wurde das Gel inkubiert und kurz mit ddH₂O abgespült. Anschließend wurde es in der Entwicklungslösung inkubiert und die Reaktion wurde so schnell wie möglich durch Zugabe 50 mM Na₂EDTA gestoppt, sofern die Banden dunkel genug waren. Das Gel wurde nach dem Waschen in ddH₂O fotografiert.

2.1.11 Bioinformatische Analyse

2.1.11.1 RNA-seq

Alle paired-end RNA-seq Sequenzstücke (Reads) wurden ins FASTQ Format umgewandelt, ihre Qualität wurden mit FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) gesteuert und weiter mit FLEXBAR [Dodt, et al., 2012] verarbeitet. Wir kartierten die Reads auf die jeweiligen Genome von WormBase [Harris, et al., 2010](Release 210) durch Zylinderhut 1.4.0 [Trapnell and Salzberg, 2009]. Die Werte der relativen Veränderung (*fold change*, FC) und ihre statistische

Signifikanz wurden mit Cufflink 1.3.0 [Trapnell, et al., 2010] unabhängig voneinander für den Dauer/nicht-Dauer-Mix Vergleich und für den Daueraustritt berechnet.

2.1.11.2 Proteom

Wir erzielten mit dem Software MaxQuant 1.2.2.5 [Cox and Mann, 2008] die Identifikation und konnten die Intensität der Peptide anhand von Rohdaten detektieren. Die Intensitäten der Peptide von jedem biologischen Replikat wurden mit der Methode von der Varianzstabilisierenden Transformation, die ein Modell für die additiv-multiplikativen Fehler ist (siehe [Huber, et al., 2002] für Details), verarbeitet. Die relative Veränderung der Peptide und ihre Signifikanz wurden mit dem limma-Paket [Smyth, 2004] auf der Grundlage der normalisierten Intensität berechnet. Die Normalisierungsverfahren wurden durch Protein Spike-ins (siehe Abb. 3-8) überprüft. Die relative Veränderung der Proteinmenge wurde durch die 1 bis 3 intensivsten Peptiden ähnlich wie dem Verfahren TOP3 [Silva, et al., 2006] eingeschätzt. Alle Proteinisoformen aus einem einzigem Genlocus wurden in einer Proteingruppe sortiert. Die Peptide, die auf mehrere Loci (non-unique Peptide) kartiert wurden, wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

2.1.11.3 Gene Ontology (GO) Analyse

Wir führten eine funktionelle Analyse mit Gene Ontology (GO) über Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) mit dem topGO Paket [Alexa, et al., 2006] durch. Die Größe des minimalen Knotens wurde auf 5 gesetzt. Die Abgrenzung des p-Werts wurde auf 0,05 eingestellt.

2.1.11.4 Interpro/Pfam Domain Annotation

Wir annotierten die Proteome von *C. elegans* und *C. briggsae* in Übereinstimmung mit der Protein PFAM Domain-Datenbank (PFAM Release V24 [Finn, et al., 2010]). Die Protein-HMM-Durchsuchung wurde mit der Software HMMer 3.0 [Eddy, 2009] mit der Abgrenzung des p-Werts von 0,001 durchgeführt.

2.1.11.5 KEGG Stoffwechselwege Analyse

Die andere funktionelle Analyse wurde mittels KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) durchgeführt. Wir fragten vom KEGG SOAP-Server (siehe www.genome.jp/kegg/soap für Details) die neueste Kartierung von Genen zu Stoffwechselwegen für *C. elegans* und *C. briggsae* ab. Wir verwendeten den Fisher-Exact-Test auf einer 2x2 Kontingenztafel zum Test der Gen-Set Anreicherung von einem bestimmten Stoffwechselweg.

2.1.11.6 popomR

Analyse wie in Schüler et al. 2014, Genome Biology

2.2 Materialien

2.2.1 Wurmstämme und Bakterien

| Name | Relevante Genotype | Herkunft |
|----------------------------|---|------------------------------|
| <i>C. elegans</i> N2 | Wildtypstamm | Rajewsky's Lab, MDC-Berlin |
| <i>C. briggsae</i> AF16 | Wildtypstamm | Rajewsky's Lab, MDC-Berlin |
| <i>P. pacificus</i> RS2333 | Wildtypstamm | Sommer's Lab, MPI Tübingen |
| <i>S. ratti</i> | Wildtypstamm | Brattig's Lab, BNITM Hamburg |
| <i>C. elegans</i> GH626 | <i>umps-1</i> Knockout Stamm | CGC, USA |
| <i>E. coli</i> OP50 | ura- | Sommer's Lab, MPI Tübingen |
| <i>E. coli</i> AT713 | F ⁻ <i>thi-1 argA21 cysC43 lysA22 mtl-2 xyl-7 malA1 rpsL104 λ^r λ⁻ supE44</i> | Rajewsky's Lab, MDC-Berlin |

2.2.2 Geräte und Zubehör

| Funktionen | Gerätebezeichnung und Zubehör | Hersteller |
|-------------------------|--|----------------------------------|
| Freezer und Kühlschrank | Ultra-low Temperature Freezers, Forma 900 Series (-80°C) | Thermo Scientific |
| | Liebherr CUPes 3553-20 (4°C und -20°C) | Liebherr |
| Gelelektrophorese | PerfectBlue Gel System Mini S | Peqlab |
| | Power Source 300 V | VWR |
| Homogenisator | Precellys®24 | PEQLAB Biotechnologie GmbH |
| | MicroTube with cap and graduations | VWR |
| | Glass Beads 0,5 mm dia. | BioSpec |
| Inkubator und Shaker | Incubator Advantage Lab (37°C) | Avantage Lab, Deutschland |
| | Kühlbrutschrank Binder KB115 | BINDER GmbH |
| | Incubator shaker Innova 42 | New Brunswick Scientific, USA |
| | Incubator shaker Innova 44 (37°C) | New Brunswick Scientific, USA |

| | | |
|---------------------------------|---|---|
| Konzentrationsbestimmung | Incubator SANYO (16°C) | SANYO |
| | NanoDrop 1000 Photometer | Thermo Scientific |
| | Qubit® 2.0 Fluorometer | Invitrogen |
| | Tube für Qubit 2.0 | Life Technologie |
| | Infinite® M200, Tecan | Tecan Group Ltd. |
| LC-MS/MS | LTQ-Orbitrap Velos | Thermo Scientific |
| | Eksigent nanoLC ultra-1D+ | Eksigent |
| Mikroskope und Abbildungssystem | Microscope Axio Observer Z.1 | Zeiss, Deutschland |
| | Microscope Stereo Discovery V12 | Zeiss, Deutschland |
| | KL1500 LCD | Zeiss, Deutschland |
| | Microscope Zeiss Stemi 2000 | Zeiss, Deutschland |
| | CL1500 ECO | Zeiss, Deutschland |
| | FUJIFILM LAS 4000 | FUJIFILM |
| PCR Reaktion | Bio Doc imaging System UV | UVP |
| | UV Transilluminator | Spectroline, USA |
| | StepOnePlus Real time PCR System | Applied Biosystems |
| | Thermocycler GeneAmp®PCR System 9700 | Applied Biosystems |
| | | |
| Pure lab water System | Milli-Q Biocel System A10 | Millipore |
| Qualitätskontrolle | Agilent 2100 Bioanalyzer | Agilent Technologies |
| Sequenzierung | HiSeq 2000 | Illumina |
| Sicherheitswerkbank | BDK-SK1500 | BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Deutschland |
| | Captair® Biocap™ RNA DNA dynamische Werkbank | Erlab® Group |
| Themomixer | Eppendorf Themomixer Comfort 5355 | Eppendorf |
| Ultraschall-Homogenisator | SONOPULS HD 2070 | Bandelin |
| UV-crosslinker | Stratalinker 2400 | STRATAGENE |
| Waage | Kern Präzisionswaage 572 | KERN & SOHN GmbH, Deutschland |

| | | |
|------------------|---|--------------------------------|
| | Denver Instrument SI-234 | Denver Instrument, USA |
| Wurmzähler | BioSorter® Instrument | Union Biometrica |
| Zentrifugation | Tischzentrifuge VWR CT15 RE | VWR |
| | Zentrifuge HERAEUS Multifuge 3 SR+ | Thermo Scientific |
| | SORVALL RC6+ Zentrifuge | Thermo Scientific |
| | Rotational-Vacuum-Concentrator RVC 2-33 CDplus | Martin Christ GmbH |
| Andere Labgeräte | SevenEasy™ pH meter | Mettler Toledo |
| | Rotator Labinco model LD79 | Labinco, Deutschland |
| | Vortex-Genie 2 | Scientific Industries, Inc. |
| | Magnetrührer mit Heizplatte | VWR |
| | RCT classic IKAMAG® safety control | |
| | Pipette | Eppendorf |

2.2.3 Medium und Pufferlösung

M9 Puffer

1 L: 3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl, 1 ml 1 M MgSO_4 (MgSO_4 kann nach dem Autoklavieren zugegeben werden, muss dann aber durch einen 0,2 μm -porigen Filter gefiltert werden), autoklavieren, Lagerung bei RT.

S-Medium

1 L S-Basal: 5,85 g NaCl, 1 g K_2HPO_4 , 6 g KH_2PO_4 , 1 ml Chloesterol (5 mg/mL in 95% Ethanol), autoklavieren.

1 L S-Medium: 1 L S-Basal, 3 ml 1 M MgCl_2 (autoklaviert), 3 ml 1 M CaCl_2 (autoklaviert), 10 ml 1 M

K-Zitrat pH 6.0 (100 ml ddH₂O und 21,01 g Zitronensäure Monohydrat, pH-Wert einstellen mit KOH bei RT, autoklavieren).

Phosphate-buffered Saline (PBS Puffer)

1 L: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄

Dropout-Wachstumsmedium für Würmer

1 L: M9 minimale Salzlösung (8,5 g Na₂HPO₄•2H₂O, 3 g KH₂PO₄, 0,5 g NaCl, 1 g NH₄Cl), 2,7 g CMS-Arg-Lys-Ura, Aminosäure Master-Mix (Histidin und Methionin jeweils 70 mg, L-Asparagin, L-Alanin, L-Cystein, L-Glutaminsäure, L-Glutamin, Glycine, L-Histidin, L-Proline und L-Serin jeweils 150 mg), 2 ml 1 M MgSO₄, 100 µl 1 M CaCl₂ und 20 ml 20% Glucose. Die leichten oder schweren L-Lysine und L-Arginine wurden nach dem Bedarf des Experiments zugegeben (je 150 mg).

Harnstoff-Lysepuffer für LC-MS/MS

8 M Harnstoff, 100 mM Tris-HCl, pH 8,25

Lyse/Bindungspuffer für popomR

100 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, pH 8, 1% Lithiumdodecylsulfat, 5 mM Dithiothreitol

NP40-Waschpuffer für popomR

50 mM Tris-HCl pH 7,5, 140 mM LiCl, 2 mM EDTA pH 8, 0,5% NP40, 0,5 mM Dithiothreitol

Elutionspuffer für popomR

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

Fixierungslösung für Silberfärbung

30 ml Ethanol, 15 ml Essigsäure, 55ml H₂O

Inkubationslösung für Silberfärbung

0,5 M NaOAc, 12mM Na₂S₂O₃, 0,125% Glutaraldehyd, 25% Ethanol

Färbelösung für Silberfärbung

0,1% AgNO₃ in H₂O, 0,011% Formaldehyd

Entwicklungslösung für Silberfärbung

6,25 g Na₂CO₃, 250ml ddH₂O, 75 ul 37% Formaldehyd

2.2.4 Kits

| Name | Hersteller |
|---|----------------------|
| SuperScript®First-Strand Synthesis System for RT-PCR | Invitrogen |
| TruSeq RNA Sample Prep Kit | Illumina |
| NEXTflex directional RNAseq Reaction Kit (dUTP based) | Bioo Scientific |
| Agilent RNA 6000 Nano Kit | Agilent Technologies |
| Agilent DNA 1000 Kit | Agilent Technologies |
| Qubit® RNA Assay Kit | Invitrogen |
| Qubit® DNA Assay Kit | Invitrogen |

2.2.5 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

| Name | Hersteller | Beschreibung |
|-----------------------------|--------------------------------------|--|
| 21G-Nadel, 26G-Nadel | Becton Dickinson | |
| 25S-Δ7-dafachronic acid | Prof. Dr. H.-J. Knölker | TU Dresden |
| Acetonitril | | CH ₃ CN |
| Acrylamide Gel Solution 30% | Carl Roth | 37,5 : 1 |
| Agarose NEEO Ultra | Carl Roth | |
| Ammoniumhydrogencarbonat | Carl Roth | NH ₄ HCO ₃ |
| Ammoniumsulfat | Carl Roth | (NH ₄) ₂ SO ₄ |
| Ammoniumchlorid | Carl Roth | NH ₄ Cl |
| Antibiotic-Antimycotic | Life Technologies | |
| Alanin, L- | Sigma Aldrich | |
| Ammonium Persulfate | Promega | APS (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ |
| Arg-10 | Cambridge Isotope Laboratories, Inc. | Arginine 10, L-, U- ¹³ C ₆ , U- ¹⁵ N ₄ |
| Arginine, L- | LKT Laboratories, Inc. | |
| Asparagin, L- | Sigma | |

| | | |
|--------------------------------------|--------------------------|--|
| Bottel Top filter 150 ml und 500 ml | Nalge Nunc | |
| C18-Beads | Reprosil-AQ, Dr. Maisch | |
| Calciumchlorid | Carl Roth | CaCl_2 |
| Cholesterin (Chloesterol) | Carl Roth | $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$ |
| CMS-Arg-Lys-Ura | Sunrise Science Products | Complete Supplement Mix without Arg, Lys, Ura |
| Cystein, L- | Sigma Aldrich | |
| di-Kaliumhydrogenphosphat | Carl Roth | K_2HPO_4 |
| Dimethylformamide, N,N- (DMF) | Sigma Aldrich | $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$ |
| di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat | Carl Roth | $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ |
| DNase I Amp. Grade | Invitrogen | |
| DNase I Reaction Buffer | Invitrogen | |
| dNTP | Promega | |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma Aldrich | |
| EDTA Dinatriumsalz Dihydrat | Carl Roth | $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ |
| Empore Cartridges | 3M | |
| Essigsäure 100% | Carl Roth | CH_3COOH |
| Ethanol 70% | Carl Roth | |
| Ethanol >99.5% | Carl Roth | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ |
| Ethidiumbromid | Invitrogen | |
| Ficoll 400 BioChemica | AppliChem | |
| Formaldehyd 37% | Carl Roth | HCHO |
| Glucose, D- | Carl Roth | $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ |
| Glutamine, L- | Sigma Aldrich | |
| Glutaminsäure, L- | Sigma Aldrich | |
| Glutaraldehyd | Sigma Aldrich | $\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CHO})_2$ |
| Glycerin | Carl Roth | |
| Glycine | Sigma Aldrich | $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ |
| Glykogen | Invitrogen | |
| goTaq Polymerase und Reaktionspuffer | Promega | |
| Harnstoff | Carl Roth | $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ |
| HEPES | Carl Roth | |
| Histidin | Sigma Aldrich | |
| Hybond-N(+), Amersham | GE Healthcare | |

| | | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|---|
| Hyper Ladder I und IV | Bioline | |
| Iodacetamid | Sigma Aldrich | C_2H_4INO |
| Kaliumchlorid | Carl Roth | KCl |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Carl Roth | KH_2PO_4 |
| Kaliumhydroxid | Carl Roth | KOH |
| LB, Lennox | Carl Roth | |
| Lithium chloride | Carl Roth | LiCl |
| Lithium dodecylsulfate | Carl Roth | $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Li$ |
| LysC | Wako | |
| Lys-8 | Cambridge Isotope Laboratories, Inc. | Lysine 8, L-, U- $^{13}C_6$, U- $^{15}N_2$ |
| Lysine Monohydrate, L-(+) | LKT Laboratories, Inc. | |
| Magnesiumchlorid Hexahydrat | Carl Roth | $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | Carl Roth | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ |
| Methansäure | Carl Roth | HCOOH |
| Methionin | Sigma Aldrich | |
| Natriumacetat | Carl Roth | $C_2H_3NaO_2$ |
| Natriumchlorid | Carl Roth | NaCl |
| Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat | Carl Roth | $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ |
| Natriumhydroxid | Carl Roth | NaOH |
| Natriumhypochloritlösung, 12% Cl | Carl Roth | NaOCl |
| Natriumsulfat | Carl Roth | Na_2SO_4 |
| Natriumthiosulfat | Sigma | $Na_2S_2O_3$ |
| Natriumcarbonat | Sigma | Na_2CO_3 |
| Nematode Growth Medium Powder | USBiological, USA | |
| NP40 | Fluka, Sigma Aldrich | |
| Nukleasefrei Wasser | Ambion, Invitrogen | |
| Oligo(dT) Beads | Invitrogen | Dynabeads®Oligo(dT)25 |
| Proline, L- | Sigma Aldrich | |
| Propanol, 2- | Carl Roth | Isopropanol |
| Proteinase K | Qiagen | |
| RNase A | Qiagen | |
| RNase away Spray | Molecular BioProducts | |
| RNase I | Ambion, Invitrogen | |

| | | |
|------------------------------|--------------------|---|
| Saccharose, D- | Carl Roth | Sucrose |
| Salzsäure, 1N Lösung | Carl Roth | HCl |
| SDS / Natriumlaurylsulfat | Carl Roth | C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S |
| Serin, L- | Sigma Aldrich | |
| Silbernitrat | Sigma Aldrich | AgNO ₃ |
| Spritzenfilter steril 0,2 µm | Carl Roth | |
| SybrGreen Master Mix, 2x | Applied Biosystems | |
| Trichlormethan / Chloroform | Carl Roth | CHCl ₃ |
| TRIS Hydrochlorid | Carl Roth | |
| Trizol Reagent | Ambion, Invitrogen | |
| Trypsin | Applied Biosystems | |
| Uracil | USBiological, USA | |
| Zirkoniumbeads | SiLi, Deutschland | |
| Zitronensäure Monohydrat | Carl Roth | C ₆ H ₈ O ₇ * H ₂ O |

2.2.6 Real-Time PCR Primer

| Sequenz | Beschreibung | Hersteller |
|------------------------|--|----------------|
| CCGATCTAAGCCGAAGTGAA | <i>cel-alg-2</i> qPCR Vorwärts-Primer (F) | BioTez, Berlin |
| TTGAGACAGAGGTTGGAGAGTG | <i>cel-alg-2</i> qPCR Rückwärts-Primer (R) | BioTez, Berlin |
| ATTTTCGCGTCGTTAGCAGT | <i>cel-dcr-1</i> -F | BioTez, Berlin |
| CGCATCATGTGGAAAATCAC | <i>cel-dcr-1</i> -R | BioTez, Berlin |
| AAAGGAACGGCAAATCACAC | <i>cel-drsh-1</i> -F | BioTez, Berlin |
| TATCCATGTTTCAGGCCACA | <i>cel-drsh-1</i> -R | BioTez, Berlin |
| GCCACAGTTCCCAAACAGAT | <i>cel-ain-1</i> -F | BioTez, Berlin |
| TTGACTTGATGAGCCTGTGC | <i>cel-ain-1</i> -R | BioTez, Berlin |
| TAAGGCTGACGCTCCAAAGT | <i>cel-vig-1</i> -F | BioTez, Berlin |
| TTGCTTTCTTGGAGCCTTGT | <i>cel-vig-1</i> -R | BioTez, Berlin |

2.2.7 Bioinformatische Datensätze für Proteome

c_elegans.WS230.protein.fasta 25634

c_briggsae.WS230.protein.fasta 21961

3. Ergebnisse

3.1 Vergleichende Analyse von Dauer- und infektiösen Larven auf der RNA-Ebene

Genexpression im weiteren Sinne ist der Prozess des Umschreibens der Erbinformation von DNA in RNA und deren Übersetzung in Protein. Mutationen der DNA-Sequenz werden in der Population durch neutralen Gendrift und/oder natürliche Selektion vererbt oder beseitigt. Die Evolution der Gensequenz bietet eine Grundlage für das Entstehen neuer Eigenschaften. Die Regulation von Transkription und post-Transkription bei der Genexpression spielt auch eine wichtige Rolle, die RNA-Mengen von allen Transkripten beeinflussen kann. Ausgehend von der Hypothese des ursprünglichen Dauerstadiums als Präadaptation für den Übergang zur parasitären Lebensweise ist eine Konservierung der Proteinsequenz und auf Genexpressionsebene zwischen Dauer- und infektiösen Larven wegen des gemeinsamen Ursprungs denkbar. Wir präsentieren eine umfassende globale Analyse mittels des Vergleichs von Genexpressionsänderung auf RNA-Ebene und Protein-Sequenzvariation von Dauer- und infektiösen Larven.

Moderne Hochdurchsatz-Verfahren für RNA-seq bieten uns die Möglichkeit, die globalen Veränderungen der Genexpression auf der RNA-Ebene zu erfassen. Auf der HiSeq2000 Plattform von Illumina wurden die cDNA-Bibliotheken für RNA Proben von Dauerlarven (SDS-reinigt) für *C. elegans*, *C. briggsae* und *P. pacificus* sowie Proben von infektiösen Larven für *S. ratti* sequenziert. Zum Vergleich von Dauer- und infektiösen Larven integrierten wir unsere Ergebnisse und den publizierten Datensatz von infektiösen *S. stercoralis* Larven aus der Veröffentlichung [Stoltzfus, et al., 2012]. Abb. 3-1 zeigt die Korrelation der FPKM (engl. *fragments per kilobase of exon per million fragments mapped*) über die verschiedenen RNA-seq Datensätze. Unsere Ergebnisse von *S. ratti* sind mit dem veröffentlichten Datensatz von *S. stercoralis* stark korreliert. Freilebende *C. elegans* und die möglichen Zwischenform *P. pacificus* haben eine höhere Korrelation untereinander als zu den Parasiten.

Die Proteinsequenzen von vier Nematodenspezies wurden durch OrthoMCL [Li, et al., 2003] analysiert und alle Orthologe und Inparalogue wurden zu orthologen Gruppen zusammengefasst. Das Programm Muscle [Edgar, 2004] wurde zum Alignment der Proteinsequenzen innerhalb einer orthologen Gruppe verwendet. Die multiplen Alignments dienten als Eingabe für die phylogenetische Rekonstruktion mittels PhyML (Abb. 3-2.A). Für jede orthologe Gruppe erstellten wir komplementär aus den euklidischen Abständen der Expressionswerte eine Distanzmatrix für die

Erstellung eines Genexpressionsbaums (Abb. 3-2.B) und eines zugehörigen Genexpressionsbaums (Abb. 3-2.C).

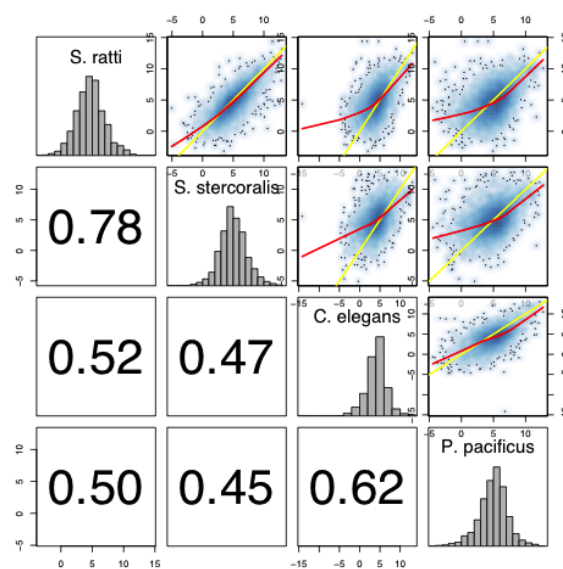


Abb. 3-1 Paarweise Korrelation von FPKM-Werten aus RNA-seq in vier Nematodenspezies

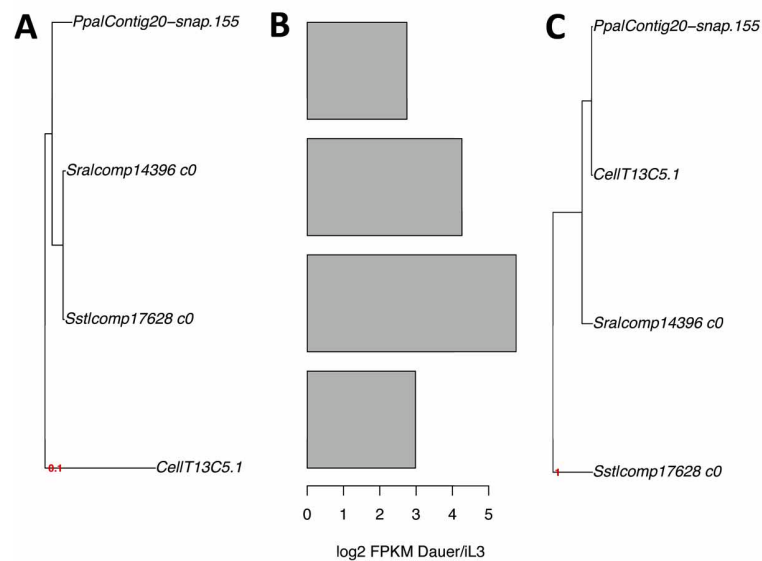


Abb. 3-2 Proteinsequenzvariation und Expressionsänderung für die Orthologen von DAF-9 (T13C5.1)

A: Proteinsequenzvariation mittels multiplen Alignments, B: FPKM-Werten aus RNA-seq, C: Genexpressionsänderung

Zur Auswertung der Konservierung und Divergenz der Evolution in vier Nematodenspezies wurden die Längen aller Äste auf jedem Baum für Proteinsequenz und auf dem zugehörigen

Genexpressionsbaum berechnet. Abb. 3-3 zeigt die Korrelation von Proteinsequenzvariation und Expressionsänderung über 3.569 orthologe Gengruppen. Der dunkelste Bereich der Punktwolke besteht aus den Proteinen, bei dem der Durchschnitt der Proteinsequenzvariation sowie die durchschnittliche Expressionsänderung zu finden ist. Die Proteingruppen unten links (UL) sind in vier Nematodenspezies konserviert und die oben rechts (OR) sind divergent wegen der schnellen Evolution. Die Proteingruppen oben links (OL) sind bei der Sequenzevolution konserviert aber divergieren bei der Genexpression. Bei den Gengruppen unten rechts (UR) ist es umgekehrt.

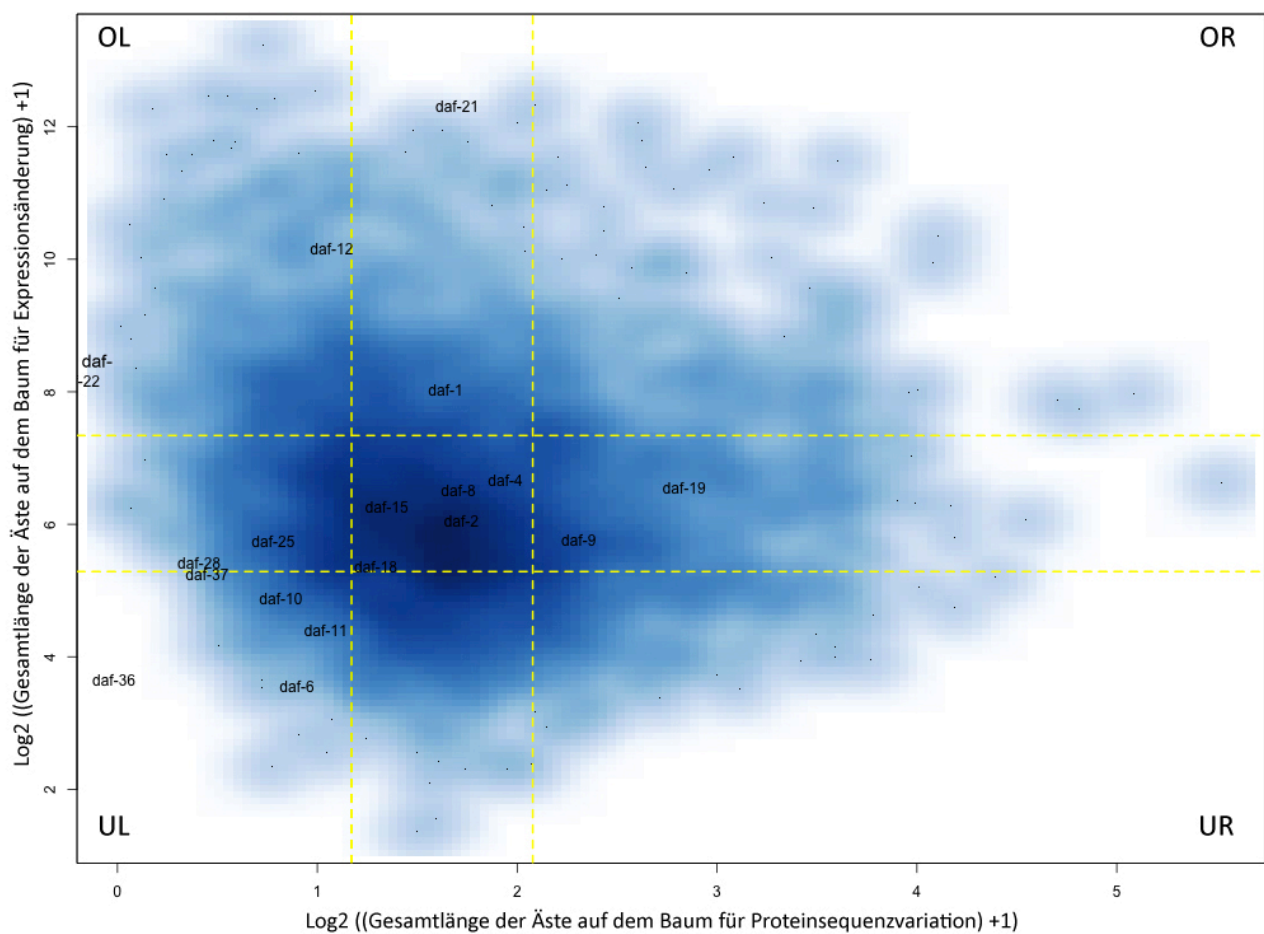


Abb. 3-3 Korrelation von Gesamtlängen der Äste auf den Bäumen für Proteinsequenzvariation und für Expressionsänderung in orthologen Gengruppen aus Dauer- und infektiösen Larven

25% und 75% Quantile sind gelb eingezeichnet. Die in allen vier Nematodenspezies identifizierten *daf*-Gene sind hier markiert. Die Ursachen für andere nicht-identifizierten *daf*-Gene sind im Kontext beschrieben.

Wir interpretieren diese Ergebnisse im Kontext von verschiedenen Pathways der Dauerbildung (Abb. 3-4). Hormone spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Entwicklung in allen Taxa.

Der Steroid-Hormon Pathway reguliert durch die Synthese von Dafachronsäuren (DAs) die Dauerbildung von *C. elegans*. Dieser endokrine Mechanismus von DAs steuert auch die Bildung infektiöser Larven in parasitären Nematoden [Ogawa, et al., 2009]. Ein Cytochrom p450 Protein DAF-9 katalysiert die Synthese der Vorläufer von Δ^4 -DA und Δ^7 -DA [Gerisch, et al., 2001; Jia, et al., 2002]. Das Upstream von der Synthese des Δ^7 -DA Vorläufer aus Cholesterol wird auch durch das Enzym DAF-36 (C12D8.5) kontrolliert [Patel, et al., 2008; Rottiers, et al., 2006]. DAs sind Steroid-Liganden des nukleären Rezeptors DAF-12 (F11A1.3), der die normale reproduktive Entwicklung fördert. Der Steroid-Hormon Pathway wirkt mit dem Insulin-like und dem TGF β -like Pathways bei Dauerbildung zusammen (Abb. 3-4). DAs können den Wildtyp in *daf-7* und in *daf-2* Daf-c Mutanten wiederherstellen [Dumas, et al., 2010; Gerisch, et al., 2001; Jeong, et al., 2010; Motola, et al., 2006]. Dafadine ist der Inhibitor von DAF-9 und führt zu Dauerbildung und Langlebigkeit von *C. elegans* [Luciani, et al., 2011]. Abb. 3-3 zeigt sowohl eine sehr kleine Sequenzvariation (viel kleiner als 25%) von DAF-36 als auch eine kleine Genexpressionsänderung auf RNA-Ebene (<25%-Quantile) in vier Nematodenspezies. Im Gegensatz dazu hat DAF-9 eine große Sequenzvariation (>75%-Quantile) und eine durchschnittliche Genexpressionsänderung (zwischen 25%- und 75%-Quantile). Das Protein DAF-12 downstream von DAF-9 als ein konservierter Rezeptor hat eine kleine Sequenzvariation (<25%-Quantile). Wahrscheinlich hat diese Konservierung DAF-12 als einen zentralen Rezeptor und Regulator für die Larvenentwicklung in Dauer- und infektiösen Larven sichergestellt oder anders gesagt, DAF-12, der als zentraler Rezeptor und Regulator fungiert, hat unter dem großen Selektionsdruck in der Evolution seine Sequenzen wenig diversifiziert. Die Genexpressionsänderung von *daf-12* in den vier Nematodenspezies ist ziemlich groß (>75%-Quantile) und es wird möglicherweise durch die Genexpressionsänderung des Regulators DAF-9 auf der oberen Ebene des Pathways stark vergrößert.

Der DAF-2/Insulin-like Pathway ist bei der Regulierung der Dauerbildung gut charakterisiert (Abb. 3-4). *daf-28* (Y116F11B.1) codiert für einen β -Typ Insulin-like Liganden, der die Rezeptor-Tyrosinkinase DAF-2 (Y55D5A.5) aktiviert und die Signaltransduktion des Insulin-like Pathways initiieren kann [Li, et al., 2003]. Das Signal verhindert die Translokation des Forkhead Transkriptionsfaktors DAF-16 (R13H8.1) in den Zellkern und blockiert die Dauerbildung [Henderson and Johnson, 2001; Lee, et al., 2001; Lin, et al., 2001]. Dieser Signaltransduktionsweg kann durch die Lipid-Phosphatase DAF-18 (T07A9.6) negativ reguliert werden [Ogg and Ruvkun, 1998]. Der Ligand DAF-28 als Startpunkt des Pathways hat eine sehr kleine Protein-Sequenzvariation (<25%-Quantile) und auch eine kleine Genexpressionsänderung auf RNA-Ebene

(ca. 25%-Quantile). Sein Rezeptor DAF-2 hat eine durchschnittliche Genexpressionsänderung und Sequenzvariation (zwischen 25%- und 75%-Quantile). Die Genexpressionsänderung und Sequenzvariationen des Suppressors DAF-18 liegen auf den 25%-Quantilen (Abb. 3-3). Zu *daf-16* wurde kein äquivalenter Lokus in *Pristionchus* gefunden.

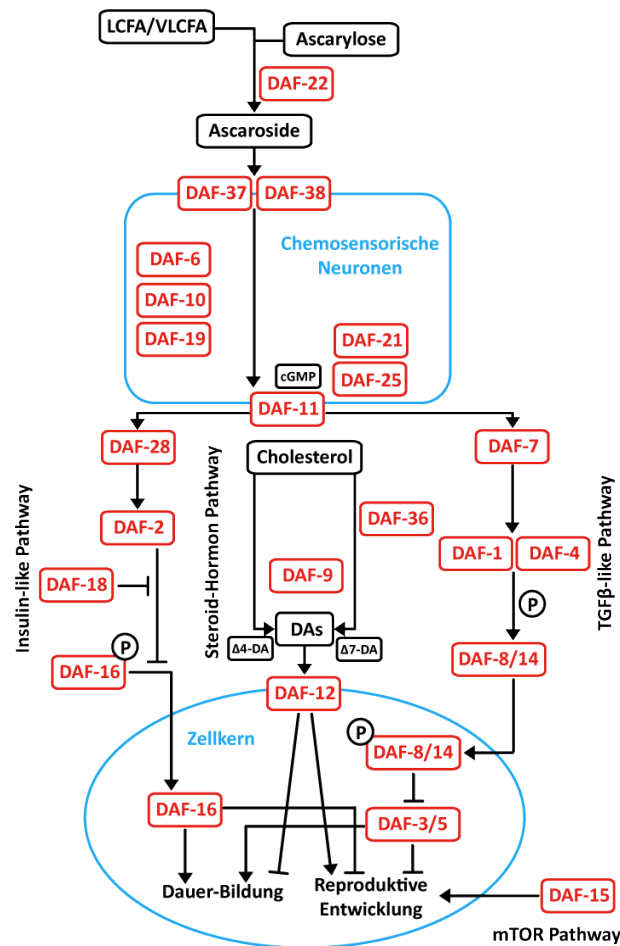


Abb. 3-4 Ein Modell der charakterisierten Pathways zur Regulation der Dauerbildung

DAF-9/Steroid Hormon Pathway, DAF-2/Insulin-like Pathway, DAF-7/TGFβ-like Pathway, DAF-11/Guanylylcyclase Pathway und mTOR Pathway

Der DAF-7/TGFβ-like Pathway ist ein weiterer Pathway zur Regulation der Dauerbildung (Abb. 3-4). Der TGFβ-like Ligand DAF-7(B0412.2) verbindet die Ser/Thr-Kinase Rezeptoren DAF-1 und DAF-4 zur Phosphorylation der R-Smad Proteine DAF-8 (R05D11.1) und DAF-14 (F01G10.8) [Estevez, et al., 1993; Georgi, et al., 1990; Gunther, et al., 2000]. Die aktiven DAF-8 und DAF-14 verhindern die Bildung eines Smad/Sno Komplexes aus DAF-3/DAF-5 und fördern damit das reproduktive Wachstum [Inoue and Thomas, 2000; Patterson, et al., 1997; Riddle, et al., 1981;

Thomas, et al., 1993]. DAF-3 beteiligt sich am Feedback der Repression der *daf-7* und *daf-8* Transkription [Park, et al., 2010]. DAF-5 ist nematodenspezifisch und homolog zu inhibitorischen Smads (I-SMAD) und interagiert physikalisch mit DAF-3. *Daf-7* wurde in unseren Proben von *S. ratti* nicht detektiert. DAF-1, DAF-4 und DAF-8 haben durchschnittliche Sequenzvariationen (zwischen 25%- und 75%-Quantil). Die Variationen der mRNA-Menge von *daf-1* (>75%-Quantil) ist höher als die von *daf-4* und *daf-8* (zwischen 25%- und 75%-Quantil). DAF-14 und DAF-3 haben keine Homologe in *S. ratti*, *R. stercoralis* und *P. pacificus*. DAF-5 hat nur Homologe in *C. elegans*, *C. briggsae* und *P. Pacificus*.

Amphiden sind die wichtigsten chemosensorischen Organe von Nematoden. Jedes Amphid im Kopf besteht aus zwölf sensorischen Neuronen mit cilierten Dendriten. Mindestens fünf verschiedene Arten von chemosensorischen Neuronen stehen mit der Dauerbildung in Zusammenhang (Bargmann, 2006). Sie können die Signale von Dauer-Pheromonen (sog. Daumone) wahrnehmen und damit Dauerbildung oder den Daueraustritt induzieren. Daumone sind Ascarosid-Derivate mit kurzen fettsäureartigen Seitenketten [Pungaliya, et al., 2009]. In *C. elegans* ist DAF-22 (Y57A10C.6) zur Biosynthese der aus kurzkettigen Fettsäuren abgeleiteten Seitenketten von Daumonen erforderlich. DAF-22 ist homolog zum humanen Sterin-Trägerprotein SCPx, das die letzten Schritte der peroxisomalen β -Oxidation von Fettsäuren katalysiert. Es könnte die Produktion von Pheromonen und die Entwicklungsentscheidung zum grundsätzlichen Stoffwechselweg hinsichtlich der Nährstoffverfügbarkeit miteinander koppeln. Die Expression von DAF-22 im Darm ist ausreichend, um Daumone zu produzieren [Butcher, et al., 2009]. Als das Kopffende des Regulationsnetzwerks von *daf*-Genen hat DAF-22 die kleinste Sequenzvariation und besitzt wahrscheinlich auch konservierte Funktionen. Um jedoch zeitlich und quantitativ die Bedürfnisse zur Produktion der strukturell und funktionell divergenten Ascaroside, die in Nematoden als Pheromone dienen, zu befriedigen, werden verschiedene Regulationsmechanismen in freilebenden und parasitären Nematoden verwendet, die wahrscheinlich zu einer großen Genexpressionsänderung führen (>75%-Quantil).

Die drei Gene *daf-6* (F31F6.5), *daf-10* (F23B2.4) und *daf-19* (F33H1.1) wurden als *Daf-d* Mutanten identifiziert. Ihre Mutationen führen zur strukturellen Missbildung in den Zilien von chemosensorischen Neuronen und zur Unfähigkeit der Erfassung der Daumone durch die Amphiden [Albert, et al., 1981]. DAF-6 ist homolog zum Hedgehog-Rezeptor Patched. In *daf-6* Mutanten oder unter Stress führt die Reduzierung der DAF-6 Expression zu struktureller

Remodellierung in den Zilien und Hochregulierung der Serotonin-Biosynthese Enzyme TPH-1 in serotonergen Neuronen ADF [Michaux, et al., 2000; Moussaif and Sze, 2009; Perens and Shaham, 2005; Perkins, et al., 1986]. Exogenes Serotonin (5-HT) erleichtert den Daueraustritt der schwach Dauer-konstitutiven Mutanten, obwohl es die Dauerbildung der Mutanten nicht verhindern kann [Daniels, et al., 2000]. DAF-10 ist ortholog zu einer Komponente (IFT122) vom intraflagellären Transport (IFT) Komplex. Es ist für den intraflagellären Transport und die Entwicklung der Amphid und Phasmid Neuronen erforderlich [Bell, et al., 2006; Qin, et al., 2001]. DAF-19 ist Transkriptionsfaktor für eine Reihe von Zilien-Genen. Im *daf-19* Mutanten verlieren alle sensorischen Neuronen ihre Zilien komplett [Swoboda, et al., 2000]. DAF-19 reguliert die 5-HT Biosynthese und angeborene Immunität [Xie, et al., 2013]. DAF-37 (C30B5.5) und DAF-38 (Y105C5A.23) sind zwei Ascarosid-Rezeptoren. DAF-37 ist *ascr#2*-spezifisch und DAF-38 reagiert mit *ascr#2*, *ascr#3* und *ascr#5*. Die Überexpression DAF-37 in ASI Neuronen erleichtert die Dauerbildung [Park, et al., 2012]. DAF-6 und DAF-10 haben wenig Proteinsequenzvariationen und Genexpressionsänderung auf RNA-Ebene (<25%-Quantil). DAF-19 ist viel höher divergent bei Proteinsequenzen (>75%-Quantil) und hat eine durchschnittlichen mRNA-Menge in Dauer- und infektiösen Larven (zwischen 25%- und 75%-Quantil). Der Rezeptor DAF-37 hat eine geringe Sequenzvariation (<25%-Quantil) und seine Genexpressionsänderung auf RNA-Ebene liegt für alle detektierten Gene in etwa auf dem 25%-Quantil. DAF-38 hat kein Homolog in *P. Pacificus*.

cGMP-Signale sind entscheidend für neurosensorische Transduktion und hängen stark mit G-Proteinen zusammen. *daf-11* (B0240.3) codiert für eine transmembrane Guanylylcyclase und DAF-11 ist das Zentrum des vierten Pathways für Dauerbildung, der Guanylylcyclase Pathway genannt wird [Birnby, et al., 2000]. DAF-11 kann die Expression von DAF-7 für den TGF- β -like Pathway [Murakami, et al., 2001] und DAF-28 für den Insulin-like Pathway steuern [Li, et al., 2003]. Das cGMP-Analogon 8-Brom-cGMP kann die Phänotypen der sensorischen Defekte von *daf-11*, *daf-21* und *daf-25* Mutanten retten. DAF-25 (Y48G1A.3) reguliert spezifisch die Lokalisierung von DAF-11 zu den Membranen der Zilien [Birnby, et al., 2000; Jensen, et al., 2010; Paradis, et al., 1999; Riddle and Albert, 1997]. *daf-21* (C47E8.5) codiert für ein molekulares Chaperon aus der HSP90 Familie in *C. elegans* und DAF-21 könnte DAF-11/TM-GC oder andere Komponenten für eine cGMP Signalübertragung stabilisieren. Ihre Aktivität ist erforderlich für die Larvenentwicklung, die negative Regulation der Dauerbildung und das Verhalten vieler spezifischer Chemosensoren [Birnby, et al., 2000; Morley and Morimoto, 2004; Murakami, et al., 2001]. DAF-11 hat geringe Proteinsequenzvariation und Genexpressionsänderung auf RNA-Ebene (<25%-Quantil). DAF-25 ist

konserviert bei Proteinsequenzen (>25%-Quantil) und hat eine durchschnittlichen mRNA-Menge (zwischen 25%- und 75%-Quantil). DAF-21 hat eine durchschnittliche Sequenzvariation aber eine außergewöhnlich große Genexpressionsänderung (Abb. 3-3), d.h. es ist konserviert bei der Sequenzevolution aber divergiert bei der Genexpression.

Die Proteinfamilie von DAF-21 enthält viele Mitglieder (Abb. 3-5-A). *Enpl-1* (T05E11.3) ist paralog zu *daf-21* in *C. elegans* und codiert auch für ein Ortholog aus der HSP90 Familie. Der Funktionsverlust von *enpl-1* durch RNAi führt zu langsamem Wachstum, Larvenarrest, unkoordinierter Fortbewegung und schwachem Defekt bei der Endozytose [Birnby, et al., 2000; Kapulkin, et al., 2005]. Die Gene GRP94/GP96 sind ortholog zu *enpl-1*, das in Menschen als ein im endoplasmatischen Retikulum lokalisiertes molekulares Chaperon und Stress-Response-Protein fungiert sowie eine mögliche extrazelluläre Rolle als cross-präsentiertes Antigen zur Aktivierung der T-Zell-vermittelten Immunantwort durch seine Fähigkeit als Peptid-Carrier spielt [Arnold, et al., 1997; Basu, et al., 2000; Binder, et al., 2000; Crossman and Nicchitta, 2007; Lammert, et al., 1997; Ramirez, et al., 2005; Singh-Jasuja, et al., 2000]. Abb. 3-5-A zeigt Proteinsequenzvariationen mittels multiplen Alignments für die zu *daf-21* orthologen und paralogen Gene in vier Nematodenspezies. Die Gene im gleichen Cluster des Evolutionbaums werden mit der gleichen Farbe markiert und ihre mRNA-Mengen in Dauer- oder infektiösen Larven werden in log2 FPKM in Abb. 3-5-B schematisch dargestellt. Damit wurde der Baum für Genexpressionsänderung hergestellt und in Abb. 3-5-C auch mit der mRNA-Menge von jedem Gen überlappt. Abb. 3-5-D zeigt uns die möglichen Genduplikationen und die Genverluste bei der Evolution in vier Nematodenspezies. Diese Abbildung wurde aus den Ergebnissen vom Alignment hergestellt ohne Rücksicht auf die Sequenzreversion durch Rückmutation, Rekombination und horizontalen Gentransfer. Der violette Cluster (*Sracomp16607 c0*, *Sstcomp18404 c0*) ist parasitenspezifisch und in den zwei freilebenden Arten verschwunden. Er spielt vielleicht eine Rolle bei der immunologischen Identifikation wie die zu *enpl-1* orthologen Gene GRP94/GP96. Im Vergleich zum *enpl-1* Cluster (hellblau und dunkelblau) verlor der *daf-21* Cluster (rot und orange) die Endoplasmin Domäne. Deswegen verlor er vielleicht die extrazelluläre Funktion. Der gelbe Cluster (*Sstcomp18969 c0*) entstand durch Genduplikation in Vorfahren aber verschwand dann in *C. elegans*, *P. pacificus* und *S. Ratti*. Der dunkelgelbe Cluster erschien nach dem Entstehen des Strongyloides Genus oder nach der Speziation.

Wir haben die Hypothese des Dauerstadiums als Präadaptation für infektiöse Larven aufgestellt. Die genauen Genfunktionen der Proteinfamilie von DAF-21 in vier Nematodenspezies wurden noch

nicht vollständig aufgeklärt und sind deswegen nicht vergleichbar. Trotzdem zeigt Abb. 3-5 in Dauer- und infektiösen Larven die kleinen Genexpressionsänderungen für *enpl-1* Cluster und für *daf-21* Cluster, die in freilebenden und parasitären Nematodenarten orthologe Gene enthalten. Diese Gene sind bei der Genexpression im Vergleich zu den parasitenspezifischen Clustern sehr unterschiedlich. Die parasitenspezifischen Cluster (violett, gelb und dunkelgelb) haben eine große Distanz im Evolutionsbaum der Proteinsequenz aber eine kleine Genexpressionsänderung. Wir vermuten, dass die heutigen Dauerlarven die Situation der Genexpression und die Mechanismen der Genregulation für das Urogen von *daf-21* und *enpl-1* in den Dauerlarven der freilebenden Vorfahren erbten. Weiterhin nehmen wir an, dass infektiöse Larven zur Anpassung an die neue Umgebung in der Evolution auch die anderen Mechanismen der Genregulation des Urogens, außer den Mechanismen in Dauerlarven, beibehielten.

DAF-15 (C10C5.6) ist für die normale Larvenentwicklung von *C. elegans* erforderlich und die *daf-15* Mutante besitzt den Daf-c Phänotyp, der irreversibel Dauer-like Larven ausbildet [Albert and Riddle, 1988]. *daf-15* ist ortholog zu RAPTOR (Regulatory Associated Protein of mTOR) und durch DAF-16 reguliert [Jia, et al., 2004; McCormick, et al., 2011]. DAF-15 besitzt eine durchschnittliche Sequenzvariation und ein Expressionsniveau auf mRNA-Ebene (zwischen 25%- und 75%-Quantil).

Neben diesen DAF-Proteinen sind viele andere Proteine, die kein-DAF-Protein (DAF: *abnormal Dauer Formation*) genannt werden, ebenfalls an der Dauerbildung beteiligt. In dieser Dissertation haben wir über solche Proteine nicht diskutiert. Die Ergebnisse für die in dieser Dissertation dargestellten DAF-Proteine weisen darauf hin, dass die meisten Proteine in der Spitze des Singalweges von Dauer- und infektiösen Larven in der Proteinsequenz und mRNA-Expression von freilebenden *C. elegans*, möglichen Zwischenformen *P. pacificus* und parasitären Strongyloides konserviert sind, z.B. DAF-36, DAF-6, DAF-10, DAF-25, DAF-37, DAF-11 und DAF-28. Zumindest sind die Proteine sehr konserviert bezüglich der Proteinsequenz, z.B. bei DAF-22. Wir fanden, dass DAF-21 und DAF-1 bei der Genexpression sehr unterschiedlich (>75%-Quantil) sind. DAF-9 und DAF-19 sind bei Proteinsequenz divergent (>75%-Quantil). In dem Bereich, in dem die Proteinsequenzvariation stark divergiert und die Genexpressionsänderung am größten ist, sind keine DAF-Proteine zu finden. Das heißt, dass DAF-Proteine während der Evolution keine gleichzeitig große Proteinsequenzvariation und große Genexpressionsänderung erfahren haben. Wir stellten auch die Hypothese auf, dass die heutigen Dauer- und infektiösen Larven von Dauerlarven der freilebenden Vorfahren eher die konservierten Mechanismen der Genregulation, d.h. eher die

Proteine in der Spitze des Regulationsnetzwerks als die konservierten Proteinsequenzen direkt erben. Es entspricht auch unserer Hypothese, dass die *daf-21* Gensequenzen in den parasitären Nematoden *Brugia pahangi* und *Haemonchus contortus* die *daf-21* Null-Mutanten von *C. elegans* nicht komplett oder gar nicht retten können [Gillan, et al., 2009].

In diesem Teil wurden Dauer- und infektiöse Larven in vier Nematodenspezies, die verschiedene Lebensweisen vertreten, durch die Proteinsequenzvariation und Genexpressionänderung auf der RNA-Ebene horizontal miteinander verglichen. Desweiteren wurden RNA-seq Datensätze für Transkriptome mit Proteom-Datensätzen zur Analyse der Dauerstadien in *C. elegans* und *C. briggsae* kombiniert.

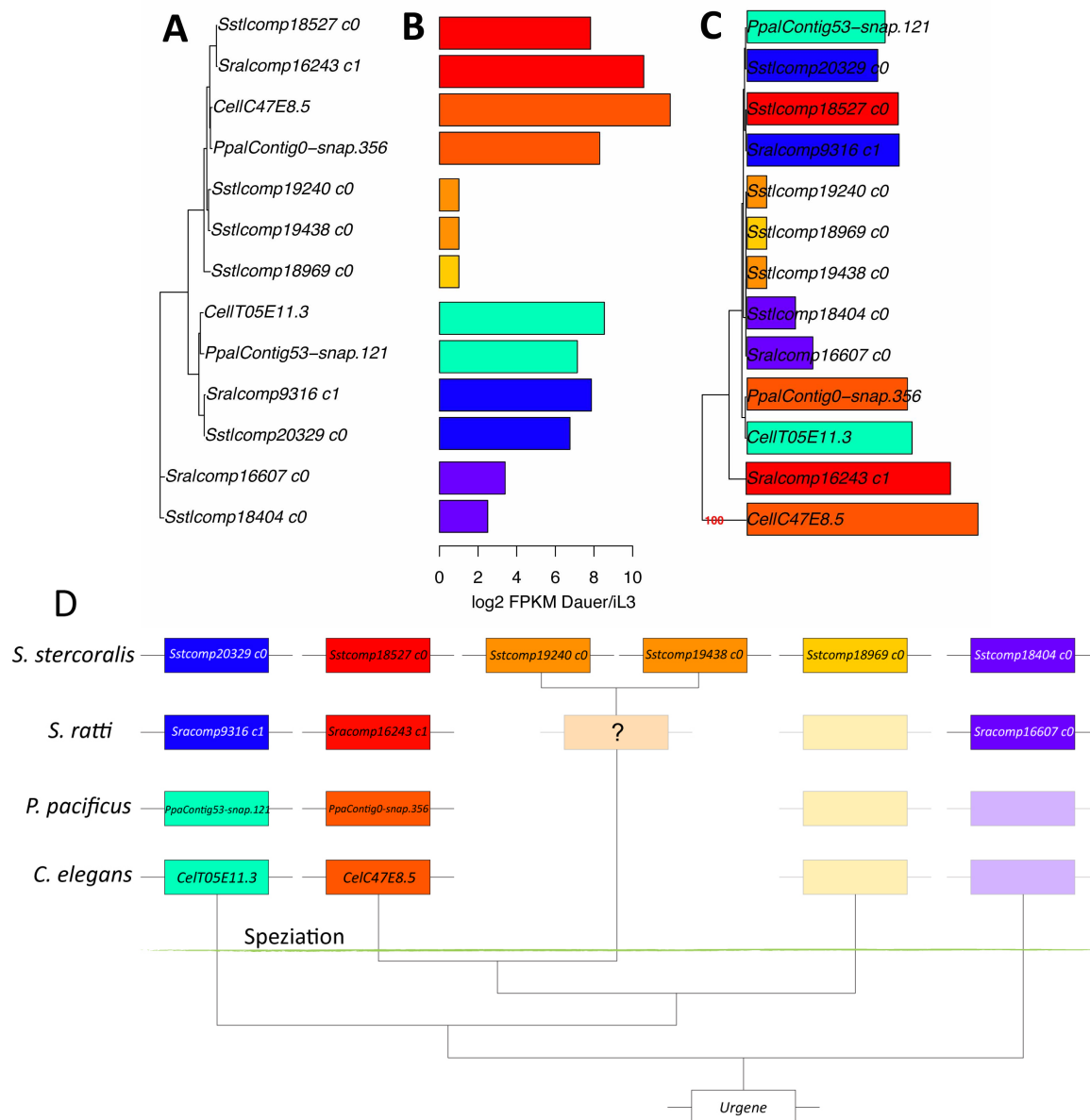


Abb. 3-5 Proteinsequenzvariation und Expressionsänderung für die Proteinfamilie von DAF-21

A: Proteinsequenzvariation mittels multiplen Alignments, C47E8.5(*daf-21*) und T05E11.3(*enpl-1*), B: mRNA-Mengen (in log2 FPKM) in Dauer- oder infektiösen Larven, die Gene im gleichen Cluster des Evolutionbaums werden mit der gleichen Farbe markiert; C: Genexpressionsbaum, der mit der mRNA-Menge von jedem Gen überlappt; D: das mögliche Modell von Genduplikation (klar) und Genverlust (trüb) bei der Evolution für die zu *daf-21* orthologen und paralogenen Gene in vier Nematodenspezies.

3.2 Ausführliche vergleichende molekulare Analyse von Transkriptom und Proteom während Dauerstadium und Daueraustritt in *C. elegans* und *C. briggsae*

Neben RNA-seq haben wir die Genexpression auf Proteinebene auch durch LC-MS/MS-basierte Shotgun Methoden quantitativ gemessen. Derzeit ist die *C. elegans* Proteom Datenbank viel umfassender annotiert als die von anderen Nematoden. Wir quantifizierten die Proteome von nicht-Dauer Mix (gemischte Wurmstadien ohne Dauerlarven), Dauerlarven und Larven des Daueraustritts für *C. elegans* und die aus der verwandten Art *C. briggsae*. Wir vergleichen in diesem Teil die Proben von Dauerlarven mit nicht-Dauer Mix (siehe 2.1.1.2) sowie die Proben vom Daueraustritt zwischen T=8 h und T=0 h (SDS-gereinigten Dauerlarven). Im Kapitel 3.3 fokussieren wir uns auf den Prozess des Daueraustritts und führen eine Zeitreihenanalyse nach dem Umsetzen der Dauerlarven auf frische Bakterien durch.

3.2.1 Vergleich von Dauerlarven zu nicht-Dauer Mix und Larven beim Daueraustritt zur Kontrolle der Dauerlarven

Nach unserer Beobachtung in der synchronisierten Flüssigkultur dauerte der Anstieg der Anzahl von Eiern während der Eiablage von der ersten Generation länger als einen Tag. Es bedeutet, dass die Entwicklungsstadien bei der zweiten Generation schon deutlich divergieren werden. Die flüssigen nicht-Dauer Mix Kulturen wurden nur anfangs synchronisiert und am 8. Tag geerntet. Die Population in der Flüssigkultur enthielt alle Entwicklungsstadien außer Dauerlarven. Wir verwendeten diesen nicht-Dauer Mix als Referenz, um die Veränderung der Genexpression von Dauerlarven auszuwerten. Bei diesem Vergleich verwendeten wir die Dauerlarven ohne SDS-Aufreinigung, weil wir einen artifiziellen Einfluss so gering wie möglich halten wollen.

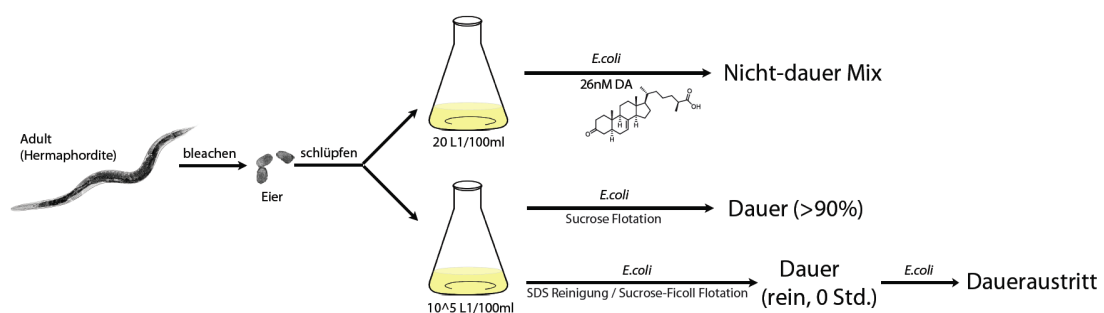


Abb. 3-6 Schematische Darstellung der Kultivierung und Präparation von Wurmproben

Dauerlarven werden von Futter stimuliert und der Daueraustritt wird durch Umsetzen der Würmer auf „frische“ Platten induziert. Nach ca. 30 min ändert sich bereits die Lipophilie der Wurmoberfläche. Der irreversible Austritt passiert ca. nach eine Stunde. Das „Pharyngeal-Pumping“, das erste sichtbare Zeichen, wird innerhalb der ersten drei Stunden beobachtet [Wang and Kim, 2003]. Nach unserer Beobachtung findet die Postdauer-Häutung nach ca. 12 Stunden ab Zugabe der Nahrung statt. Unsere Ergebnisse zeigen immense Unterschiede auf mRNA- und Proteinebene zwischen T=8 h Probe und T=0 h Probe. Würmer beim Daueraustritt T=8 h sind morphologisch und physiologisch sehr unterschiedlich zum Daueraustritt T=0 h. Es dauert noch lange bis zu Häutung. Deswegen nahmen wir an, dass die T=8 h Probe das eigentliche Postdauer-Stadium ist und wir verglichen dann die Proben beim Daueraustritt T=8 h mit der Kontrolle der Probe beim Daueraustritt T=0 h.

3.2.2 Analyse der Rohdaten von RNA-seq und LC-MS/MS für nicht-Dauer Mix, Dauerlarven und Daueraustritt T=8 h

Wir haben insgesamt 20.397 Genloci bei *C. elegans* und 20.826 Genloci bei *C. briggsae* unter mindestens einer der drei biologischen Bedingungen von nicht-Dauer, Dauerlarven (Dauer und Daueraustritt T=0) und Daueraustritt T=8 h identifiziert (Cufflinks, FPKM > 0). Die Anzahl der durch RNA-seq identifizierten Genloci entspricht 95% aller Genloci. Auch 5.316 Proteingruppen bei *C. elegans* und 4.824 bei *C. briggsae* wurden durch MaxQuant mit FDR 5% detektiert (unique Peptide ≥ 1). Abb. 3-7 zeigt mittels Venn-Diagrammen die Beziehungen der Ergebnisse für die drei biologischen Bedingungen.

Zur Qualitätskontrolle der Normalisierungsverfahren für die Proteom-Daten verwendeten wir vier exogene Proteine als interne Kontrollen. Zu jedem Verdau wurden 3,3 μg BSA, 2,8 μg Ovalbumin, 0,75 μg Cytochrom c und 3,9 μg Glycogenphosphorylase b von Kaninchen auf 100 μg verdaute Wurmproteine zugegeben. Die Intensitäten der identifizierten Peptide wurden paarweise verglichen. In Abb. 3-8 sind die Intensitäten der Peptide von exogenen Proteinen bei allen Replikaten stark korreliert und damit funktionierte die Normalisierung wie erwartet.

Alle Proben wurden auf Transkriptom- und Proteomebene durch RNA-seq und LC-MS/MS erfasst. Damit konnten wir eine umfassende molekulare Analyse im Artenvergleich durchführen und die post-transkriptionelle Regulation in *C. elegans* und *C. briggsae* untersuchen.

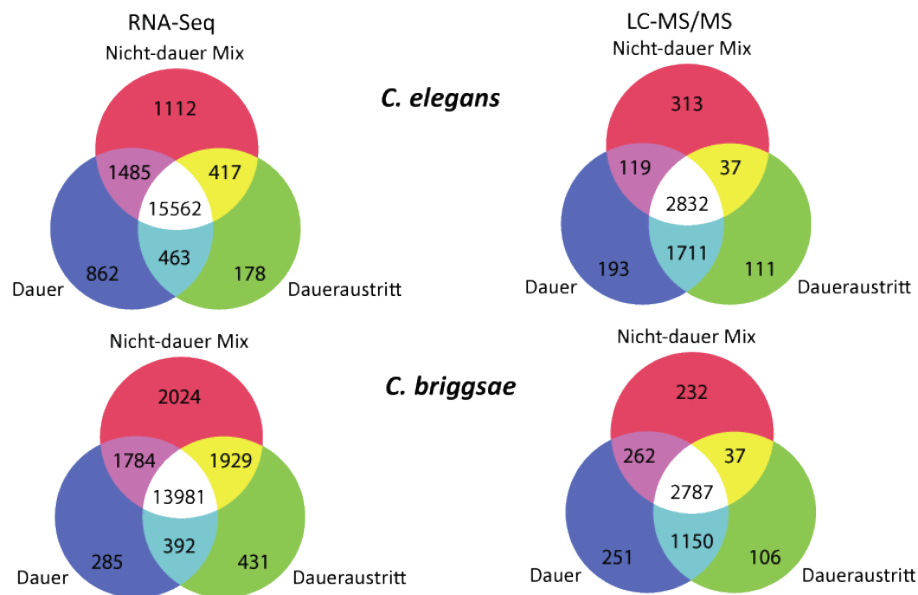


Abb. 3-7 Vergleichen der Detektion von RNA-seq und shotgun Proteomik für drei biologischen Bedingungen von *C. elegans* und *C. briggsae*

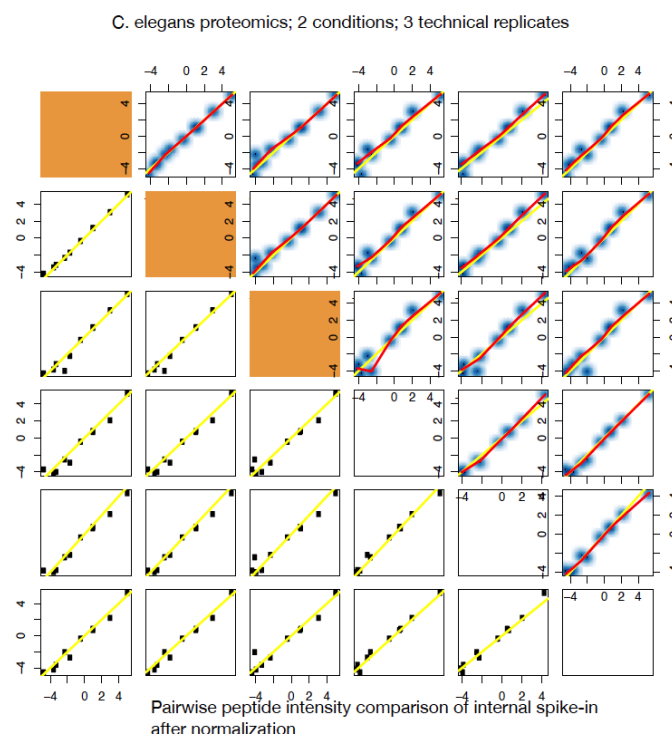


Abb. 3-8 Qualitätskontrolle der Normalisierungsverfahren für die Proteom-Daten

Jeweils 3 technische Replikate für zwei Bedingungen: drei orange Kacheln repräsentieren Dauerlarven; drei weiße Kacheln repräsentieren nicht-Dauer Mix. Die gelben Linien sind die Diagonalen. Die roten Kurven sind lokale Regressionskurven.

3.2.3 Dauer- und Daueraustritt-spezifische Proteine

Eine signifikante Proportion der Transkripte und Proteine wurde nur unter einer Bedingung identifiziert. Wir untersuchten durch die funktionelle Anreicherung von Gene Ontology Kategorien (Ashburner et al. 2000) die biologische Relevanz dieser "Zustands-spezifischen" Gene. Für die dauer-spezifischen Proteine, die nur in den Proben von Dauer aber nicht im nicht-Dauer Mix gefunden wurden, beobachteten wir eine deutliche Anreicherung der Kategorien für molekulare Funktionen wie *Sequence-specific DNA binding transcription factor* (p-Wert $< 2.7 \times 10^{-10}$; z.B. STA-1) und *Serine/threonine kinase activity* (p-Wert $< 7,9 \times 10^{-05}$; z.B. PMK-1). Eine vollständige Tabelle der GO-Anreicherung befindet sich im Anhang (Tab. S-1a). Wir entdeckten ein paar interessante Kandidaten in den Top10 der Dauer-spezifischen Proteine, wie Nematoden Astacin Protease NAS-10, Synaptotagmin SNT-1 (Downstream von DAF-19, ein schlecht charakterisiertes Mitglied in der Argonaut-Protein-Familie (C04F12.1; Yigit et al. 2006)) und eine AMP-abhängige Fettsäure-CoA-Synthetase ACS-21. Für die nur beim Daueraustritt aber nicht in Dauerlarven identifizierten Proteine bemerkten wir eine Anreicherung für die Proteine mit Triglycerid-Lipase-Aktivität (p-Wert 0,00018, z.B. Klasse 3 Lipasen) und Stearoyl-CoA 9-Desaturaseaktivität (p-Wert 0,0044; z.B. FAT-2). FAT-2 wird in Verbindung mit der Synthese eines Sperma-anziehenden Stoffs von Oozyten gebracht und ist essentiell für die Reproduktion [Kubagawa, et al., 2006]. Alle Details befinden sich im Anhang (Tab. S-1b). In unserer folgenden Analyse werden wir uns auf den Vergleich von Genen und Proteinen konzentrieren, die robust in den „Cross“-Zuständen quantifiziert werden können.

3.2.4 Hohe Konservierung von relativen Expressionsänderungen im Artenvergleich von Transkriptom und Proteom

Wir definierten durch Inparanoid [Ostlund, et al., 2010] eine Liste von 11.762 1:1 Orthologen für den Inter-Arten-Vergleich zwischen *C. elegans* und *C. briggsae*. Wir berechneten die relative Veränderung (\log_2 -FC) der Genexpression mit RNA-seq-Daten von Dauer und nicht-Dauer sowie Daueraustritt T=8 h und T=0 h in beiden Spezies. Abb. 3-9-A zeigt einen paarweisen Scatter-Plot für 8.774 1:1 Orthologe mit einer robusten Schätzung der Genexpression auf mRNA-Ebene. Wir beobachteten eine hohe Übereinstimmung der Inter-Arten bei der Veränderung der Genexpression unter gleichen Bedingungen, z.B. sind Veränderungen für Dauer und nicht-Dauer zwischen beiden Arten stark korreliert. Außerdem sind die Korrelationen zwischen den unterschiedlichen

Konditionspaaren (Dauer/nicht-Dauer zu Daueraustritt T=8 h/T=0 h) immer umgekehrt. Dies weist darauf hin, dass die hochregulierten Gene in Dauerlarven in nicht-Dauer und beim Daueraustritt herunterreguliert werden. Abb. 3-9-B zeigt eine ähnliche Situation auf Proteinebene (2.574 1:1 Orthologe). Die relative Veränderung der Proteinmenge ist unter den gleichen Konditionen hochgradig korreliert (z.B. die Korrelation von Dauer/nicht-Dauer zwischen *C. elegans* und *C. briggsae*), aber die Korrelationen unter den unterschiedlichen Konditionspaaren sind immer umgekehrt.

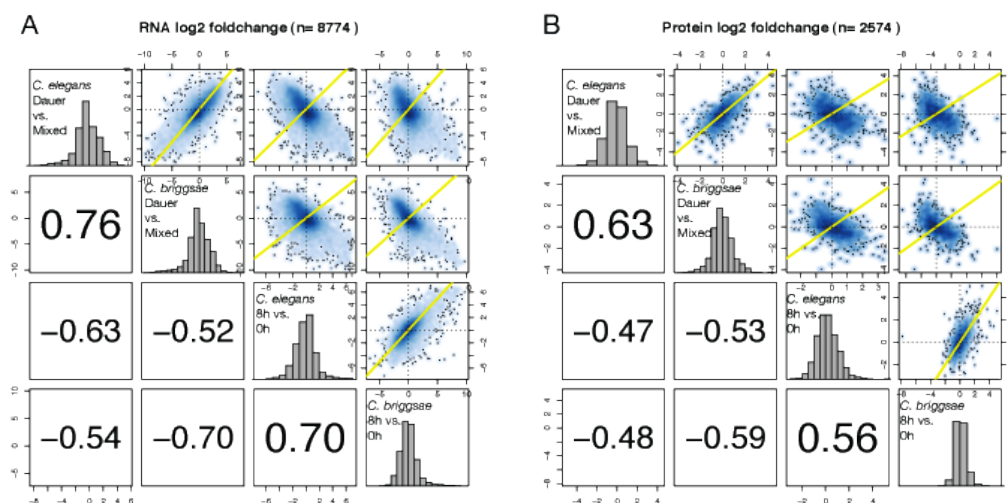


Abb. 3-9 Korrelationen der Genexpression zwischen zwei Arten auf mRNA- und Proteinebene

In Abb. 3-10 sieht man Korrelationen innerhalb derselben Art. Die relative Veränderung zwischen mRNA- und Proteinebene unter den gleichen Konditionen zeigt keine hochgradige Korrelation. Jedoch anti-korrelierte die relative mRNA-Mengenänderung von Daueraustritt T=8 h/T=0 h immer mit der relativen Protein-Mengenänderung von Dauer/nicht-Dauer. Dies deutet an, dass die mRNA-Menge der Dauer-Proteine beim Daueraustritt verringert wird, wenn dieser irreversible Daueraustritt passierte. Hier ist jedoch anzumerken, dass die relative mRNA-Mengenänderung von Dauer/nicht-Dauer immer mit der relativen Protein-Mengenänderung von Daueraustritt T=8 h/T=0 h positiv korrelierte. Wir vermuten, dass manche mRNA-Transkripte, die den Prozess des Daueraustritts programmieren, bereits in Dauer angesammelt werden. Diese Hypothese wird in den nachfolgenden Abschnitten wieder diskutiert werden.

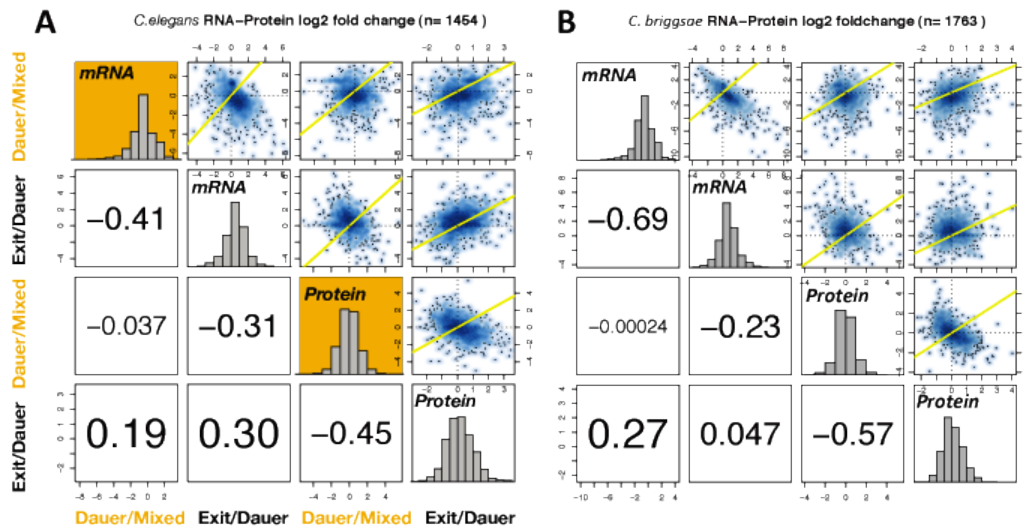


Abb. 3-10 Korrelationen der Genexpression zwischen mRNA- und Proteinebene innerhalb derselben Art

Im Weiteren werfen wir für die mRNA-Daten einen kurzen Blick auf die Homologie, die basierend auf gemeinsamen PFAM Domänen als Genfamilien definiert werden. Die Familie der Linker-Histone H1/H5 (PF00538) zeigt eine konserviert erhöhte Proteinmenge in beiden Dauerlarven. Dies gilt auch für Hitzeschock-Proteine (z.B. HSP20; PF00011) und Protease-Inhibitoren (z.B. *cystatin*; PF00031).

Ein anderer Punkt für die divergente Genexpression zwischen *C. elegans* und *C. briggsae* ist in Abb. 3-11 und Abb. 3-12 schematisch dargestellt. Die zwei Abbildungen fassen die durchschnittlichen RNA-seq Ergebnisse für PFAM-Genfamilien mit den Schätzungen der relativen Veränderung zusammen (insg. 2.957 teilweise überlappende Genfamilien; die Anzahl der Gene ≥ 2 in beiden Arten). Wir ordnen die Genfamilien nach aufsteigenden p-Werten (Kolmogorov-Smirnov-Test auf Gleichheit der unterliegenden Verteilungen) und listen die zehn signifikantesten Kategorien auf. Abb. 3-10 zeigt mehrere Kategorien, wie *Ligand-gated ion channels* (PF02931, *Neur_chan_LBD* und PF02932, *Neur_chan_memb*) und *Rhodopsin-like transmembrane receptors* (PF00001, *7tm_1 G-protein coupled receptors*) sowie die unterschiedlichen globalen Expressionsmuster in Dauerlarven zwischen beiden Arten. Abb. 3-12 zeigt ähnliche Ergebnisse beim Daueraustritt. Die zwei höchsten Signifikanzen sind die Genfamilien, die an Proteinabbau (PF00227, *proteasome*) und RNA-Reifung (z.B. *splicing* und PF00271, *helicase_C*) beteiligt sind. Außerdem sind mehrere DUF-Domänen in der zehn signifikantesten Kategorien aufgelistet, wie Nematoden-spezifische DUF290, die schwache

Ähnlichkeit mit dem Hormon-Trägerprotein Transthyretin hat. Diese divergenten Genfamilien könnten die artspezifische Programmierung von Verweilung und Austritt für Dauerlarven miteinander verknüpfen.

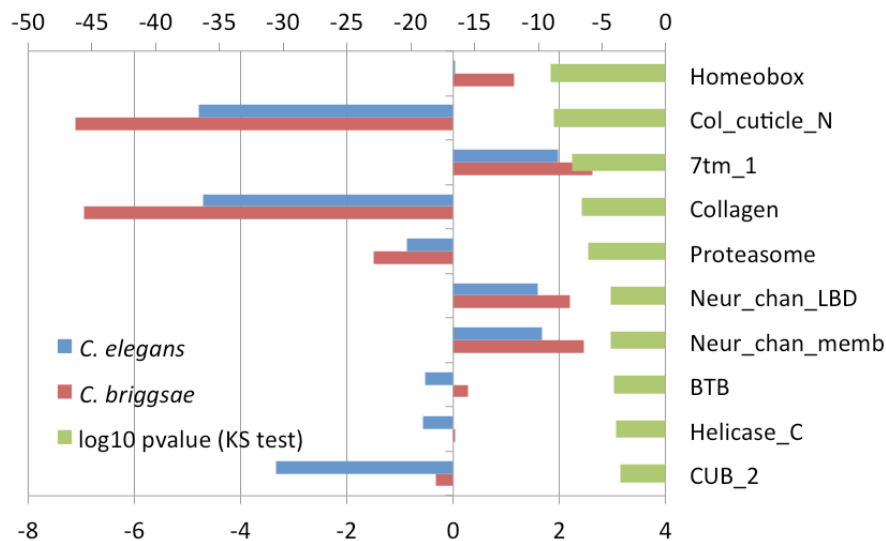


Abb. 3-11 Die zehn signifikantesten Kategorien der divergent exprimierten PFAM-Genfamilien von Dauerlarven zu nicht-Dauer zwischen *C. elegans* und *C. briggsae*

braun und blau: durchschnittliche relative Veränderungen (log2-FC) der exprimierten PFAM-Genfamilien von Dauer zu nicht-Dauer auf mRNA-Ebene; grün: log10 p-Werte für die zehn höchsten Signifikanzen der divergent exprimierten PFAM-Genfamilien mit Kolmogorov-Smirnov Test. Die p-Werte sind nicht korrigiert für multiples Testen.

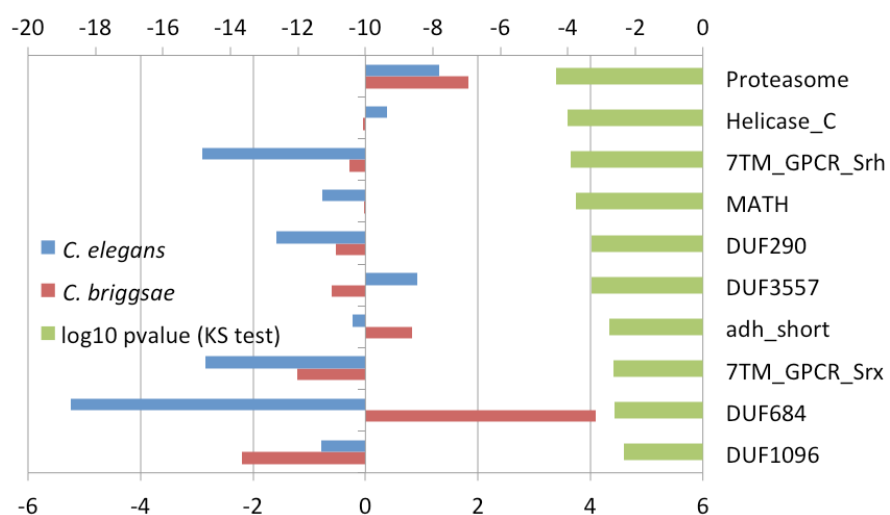


Abb. 3-12 Die zehn signifikantesten Kategorien der divergent exprimierten PFAM-Genfamilien von Daueraustritt T=8 h zu T=0 h zwischen *C. elegans* und *C. briggsae*

Farbliche Darstellung siehe oben.

3.2.5 Mögliche funktionelle Bedeutung der Veränderung der Genexpression in Dauerlarven und beim Daueraustritt von *C. elegans*

Auf Grund der hohen Konservierung der Genexpression in Dauerlarven und beim Daueraustritt zwischen *C. elegans* und *C. briggsae* und wegen der ausführlichen Annotation von *C. elegans* in der Datenbank werden wir nur für *C. elegans* die weitere Anreicherungsanalyse durchführen. Durch die funktionelle Anreicherung des Gen-Sets nach KEGG- und GO-Kategorien werden wir die Veränderungen von mRNA- und Proteinmengen in *C. elegans* auswerten. Alle Gene sind nach der Signifikanz der Veränderungen von Genexpression in drei Gruppen für die Vergleiche von Dauer und nicht-Dauer sowie von Daueraustritt T=8 h zu T=0 h eingeordnet (*limma* korrigierten p-Wert <0,05): die Gruppe "Up" besteht aus den Genen, die sich unter den gegebenen Bedingungen hochregulieren, die Gruppe "Down" umfasst die herunterregulierten Gene und die Gruppe "Diff" ist ein Mix der eben genannten Gruppen, deren Komponenten signifikant divergent exprimiert sind. Wir verwenden zuerst die KEGG-Pathway Datenbank [Kanehisa, et al., 2012], um das Expressionsmuster von verschiedenen Stoffwechselwegen auszuwerten. Jeder Stoffwechselweg wird nur in einer Gruppe seinem kleinsten p-Wert zugewiesen. In Abb. 3-13 befinden sich die Ergebnisse auf mRNA-Ebene und in Abb. 3-14 auf Proteinebene.

Ribosom ist die signifikanteste KEGG-Pathway Kategorie in den beiden Abbildungen. Auf mRNA-Ebene ist die mRNA-Menge der ribosomalen Proteine in Dauer (p-Wert $6,23 \times 10^{-50}$) hochreguliert. Auf der anderen Seite haben wir eine relative Abnahme von ribosomalen Proteinen in Dauer identifiziert (p-Wert $9,25 \times 10^{-45}$). Die Proteine sind in Bezug auf die Kategorie Ribosomenbiogenese dann beim Daueraustritt deutlich erkennbar aktiviert (p-Wert $9,54 \times 10^{-11}$). Ähnliche Veränderungen kamen auch bei der Kategorie *Purine metabolism* vor. Der Pathway beteiligt mehrere wichtige Funktionen in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen: zelluläres Wachstum und Signalübertragung, Energiestoffwechsel, Neuromodulation und Neurotransmission [Patkar, et al., 2009].

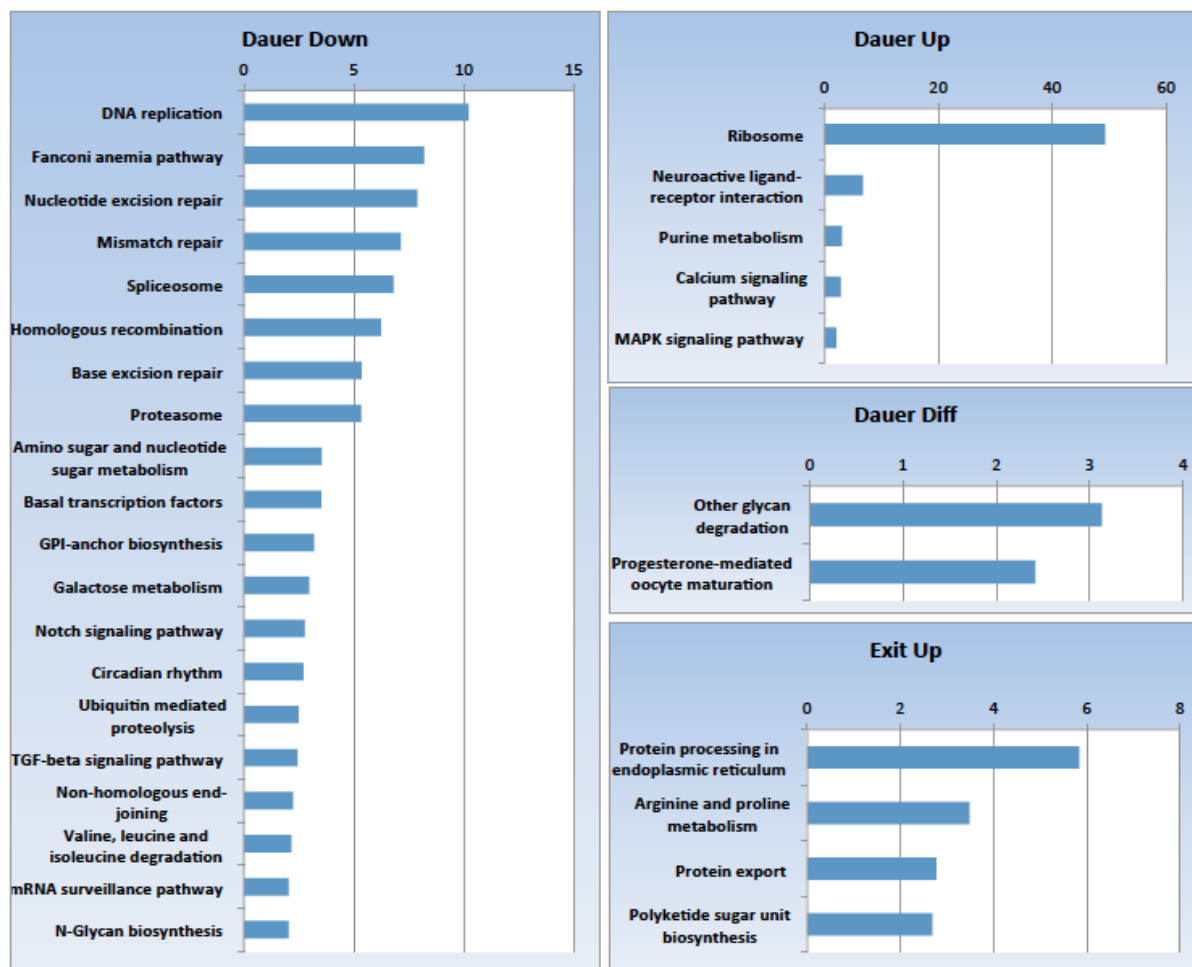


Abb. 3-13 KEGG Pathway-Gene-Set Anreicherungsanalyse für RNA-seq Daten-Set

Die Genexpression wird nach der Veränderungsorientierung kategorisiert. Die Pathways werden durch $-\log_{10}$ p-Werte eingeordnet (für $p\text{-Wert} < 0,01$, Exakte Fisher-Test). Die angegebenen p-Werte wurden nicht für multiples Testen korrigiert. Jeder Stoffwechselweg wird nur in der Gruppe für seine signifikanteste Expression (kleinster p-Wert) gezeigt.

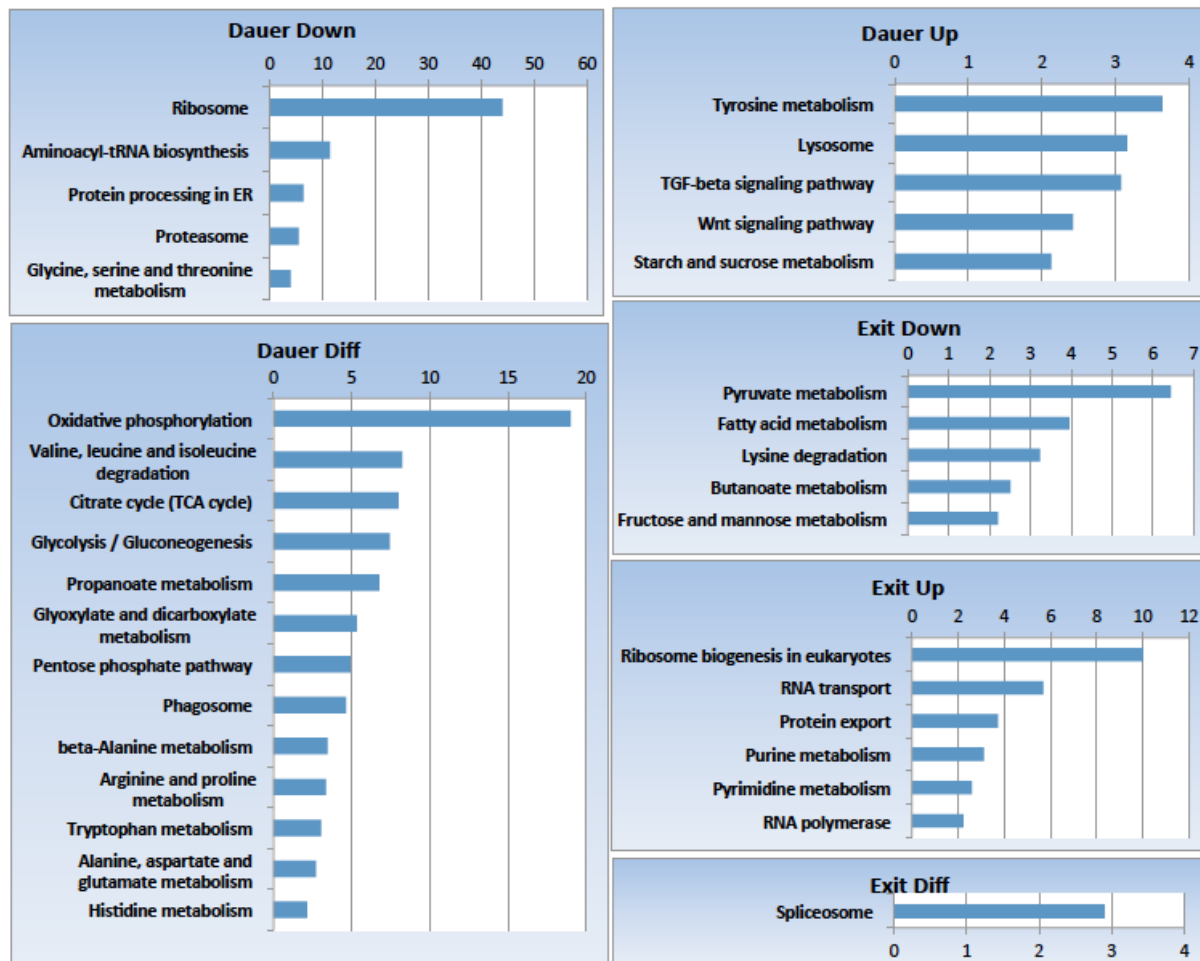


Abb. 3-14 KEGG Pathway-Gene-Set Anreicherungsanalyse für Proteom Daten-Set

Die Genexpression wird nach der Veränderungsorientierung kategorisiert. Die Pathways werden durch $-\log_{10}$ p-Werte eingeordnet (für $p\text{-Wert} < 0,01$, Exakte Fisher-Test). Die angegebenen p-Werte wurden nicht für multiples Testen korrigiert. Jeder Stoffwechselweg wird nur in der Gruppe für seine signifikanteste Expression (kleinster p-Wert) gezeigt.

Proteinsynthese und insbesondere mRNA-Translation kostet die meiste Energie in einem sich vermehrenden Organismus und muss in Abwesenheit von Nährstoffen sorgfältig abgestimmt werden. Wir kommen zu dem Schluss, dass die Proteinsynthese in Dauerlarven stark unterdrückt ist. Diese Schlussfolgerung entspricht grundsätzlich der hypometabolischen Natur von Dauerlarven [Lant and Storey, 2010]. Wir interpretieren die Anreicherung von ribosomalen mRNAs in Dauerlarven als Vorbereitung, um schnelle Ribosomenbiogenese bei Nachfrage (Daueraustritt) zu erleichtern. Dieser Befund wird weiter durch die Proteom-Daten bestätigt - Die ribosomalen

Proteine werden überwiegend beim Daueraustritt hochreguliert und die ribosomalen mRNAs bleiben auf einem hohen Niveau im mRNA-Pool. Unsere zukünftigen Studien werden die Geschwindigkeit des RNA Umsatzes in Dauerlarven aufklären und zeigen, ob die eben genannten ribosomalen mRNAs tatsächlich gespeichert werden oder stets erneuert.

Andere anabolische Prozesse im Zusammenhang mit dem DNA- und RNA-Metabolismus zeigen eine allgemeine Verringerung auf mRNA-Ebene, aber nicht auf Protein-Ebene. Insbesondere DNA-Replikation, DNA-Reparatur, basale Transkriptionsapparate, RNA-Spleißen und Stoffwechsel der Nukleotid-Zucker zeigen niedrige mRNA-Mengen im Dauerstadium.

Wir haben hier einen Beweis für die allgemeine Reduzierung der Protein-Verarbeitung und des Umsatzes in Dauerlarven, da die mRNA- und Proteinmengen der entsprechenden Gene herunterreguliert werden, insbesondere die Gene in Bezug auf Proteasom (p-Werte jeweils $4,75 \times 10^{-6}$ und $3,11 \times 10^{-6}$). Jedoch sind die lysosomalen Proteine gemäßigt in der Gruppe der hoch-regulierten Proteine in Dauer angereichert (p-Wert 0,00069). Die zugehörigen Genprodukte für Lysosomen und Autophagie sind notwendig für die Dauerbildung in *C. elegans* [Melendez, et al., 2003].

Ein anderer wichtiger Aspekt ist die Sensorik. Dauerlarven müssen Änderungen in der Umgebung sorgfältig überwachen, um z.B. auf Stressoren zu reagieren, neue Nahrungsquellen zu finden oder Populationsdichte wahrzunehmen. Die Entwicklung zum fortpflanzungsfähigen Stadium kann nur in Anwesenheit von Nährstoffen, in einer mäßigen Populationsdichte und unter angenehmen physikalisch-chemischen Bedingungen fortgesetzt werden. Die KEGG-Kategorie *Neuroactive ligand-receptor interactions* ist stark für die hochregulierten Gene auf mRNA-Ebene angereichert (p-Wert $1,8 \times 10^{-7}$). Diese Beobachtung zeigt, dass die Dauerlarven ein breites Repertoire von Transkripten für die Sensation-zugehörigen Gene aufrechterhalten.

Ähnliche Ergebnisse erhalten wir bei der Anreicherung durch GO-Kategorien des biologischen Prozesses (im Anhang Tab. S-2). Auf mRNA-Ebene sind die Gene in den GO-Termen wie *Translation* (GO:0006412; p-Wert $6,1 \times 10^{-17}$), *Oxygen transport* (GO:0015671; p-Wert $1,6 \times 10^{-12}$) und *Potassium ion transport* (GO:0006813; p-Wert $2,7 \times 10^{-11}$) in Dauerlarven hoch-reguliert, während die Terme wie *Cytokinesis* (GO:0000910; p-Wert $1,1 \times 10^{-16}$), *Hermaphrodite genitalia development* (GO:0040035; p-Wert 2×10^{-11}) und *Locomotion* (GO:0040011; p-Wert $1,4 \times 10^{-8}$) herunterreguliert sind.

Unsere Proteom-Daten (im Anhang Tab. S-3) zeigen, dass die Proteine in Bezug auf die Terme wie *Translation* (GO:0006412; p-Wert $3,3 \times 10^{-20}$), *Protein folding* (GO:0006457; p-Wert 1×10^{-9}) und *tRNA aminoacylation* (GO:0006418; p-Wert $1,2 \times 10^{-09}$) deutlich in der herunterregulierten Gruppe in Dauerlarven angereichert sind. Im Gegensatz dazu sind 9 von 12 Komponenten des TCA-Zyklus deutlich in Dauerlarven hochreguliert (GO:0006099; p-Wert $1,4 \times 10^{-05}$). Sie alle sind notwendig zum Abbau des Fetts als interne Energiequelle in Dauerlarven. Im folgenden Abschnitt werden wir uns auf den genetischen Informationsfluss im Dauerstadium und beim Daueraustritt konzentrieren.

3.2.6 Molekulare Signaturen des Dauerstadiums im genetischen Informationsfluss

Die Genexpression bezeichnet den Prozess zur Übersetzung des Genotyps – also der genetischen Information von DNA – zum Phänotyp eines Organismus durch die Biosynthese von RNA und Proteinen. Dabei wird die Genexpression auf verschiedenen Stufen reguliert. Abb. 3-15-A ist eine schematische Darstellung für den genetischen Informationsfluss von DNA zu Protein. Unsere Daten zeigen, dass mehrere Schritte in diesem Weg bei der Dauer-Entwicklung beeinflusst sind. Abb. 3-15-B zeigt die Heatmaps von der eingeschätzten relativen Veränderung für sechs ausgewählte KEGG-Pathways: *RNA polymerase/Transcription*, *Spliceosome/Splicing*, *mRNA surveillance*, *RNA transport*, *RNA degradation/Stability* und *Translation/Ribosome*. Darin sind die relativen Veränderungen der Genexpression in *C. elegans* und *C. briggsae* in denselben Heatmaps dargestellt.

Wir betrachten zunächst den Prozess der Transkription. Die Proteinmengen der RNA-Polymerase Komponenten bleiben auf ähnlichem Niveau in Dauer und nicht-Dauer sind, aber erhöht beim Daueraustritt (Wilcoxon-Test bei einer Stichprobe p-Wert $2,8 \times 10^{-6}$). Dies gilt auch für die RNA-Polymerase Komponenten auf mRNA-Ebene beim Daueraustritt (p-Wert $5,5 \times 10^{-8}$). Die spleißosomalen Proteine sind in Dauer (im Vergleich zu nicht-Dauer) leicht hochreguliert (p-Wert $4,5 \times 10^{-5}$) und verändern sich nicht beim Daueraustritt (T=8 h zu T=0 h). Allerdings sind die mRNA-Mengen der spleißosomalen Proteine beim Daueraustritt signifikant erhöht (p-Wert $1,8 \times 10^{-20}$), während sie in Dauerlarven (p-Wert $5,5 \times 10^{-21}$) nach unten reguliert sind. Ebenso zeigen die Protein-Komponenten vom Pathway *RNA-Surveillance* eine höhere Expression in Dauerlarven als bei nicht-Dauer (p-Wert $4,4 \times 10^{-5}$) aber bleiben beim Daueraustritt konstant. Im Gegensatz dazu nehmen die mRNAs in Dauerlarven im Vergleich zu nicht-Dauer stark ab (p-Wert $1,5 \times 10^{-8}$). Wir kommen durch diese Beobachtungen zu dem Schluss, dass die an Transkription und mRNA-Reifung beteiligten Proteine eine ähnliche Stufe in dem gemessenen Protein-Pool von

Dauerlarven erreichen, oder sogar stärker als in den aktiven Entwicklungsstadien (nicht-Dauer und Daueraustritt Proben) steigen.

Sobald mRNA reif ist, wird sie aus dem Zellkern ins Plasma exportiert, wo sie abgebaut oder translatiert wird. Die Proteinmengen der RNA-Transport Komponenten unterscheiden sich nicht von nicht-Dauerlarven und sind auch beim Daueraustritt (p-Wert $1,5 \times 10^{-7}$) erhöht. Ihre mRNA-Mengen erhöhen sich beim Daueraustritt (p-Wert $8,1 \times 10^{-16}$), aber sinken in Dauer im Vergleich zu nicht-Dauer (p-Wert $1,07 \times 10^{-7}$). Das Gesamtprofil für den Pathway *RNA degradation* ist ziemlich ähnlich auf mRNA- und Proteinebene. Ihre Protein- und mRNA-Mengen sind statistisch nicht signifikant verändert. Die ribosomalen Proteine zeigen deutliche Unterschiede: die Proteinmenge nimmt stark in Dauerlarven ab (p-Wert $5,9 \times 10^{-25}$) aber steigt beim Daueraustritt erheblich an (Median > 2-fach hochreguliert; p-Wert $1,6 \times 10^{-25}$). Die mRNA-Mengen der ribosomalen Proteine steigen bei beiden Bedingungen: sie sind in Dauer (p-Wert $5,42 \times 10^{-27}$) und beim Daueraustritt (p-Wert $1,48 \times 10^{-17}$) hochreguliert.

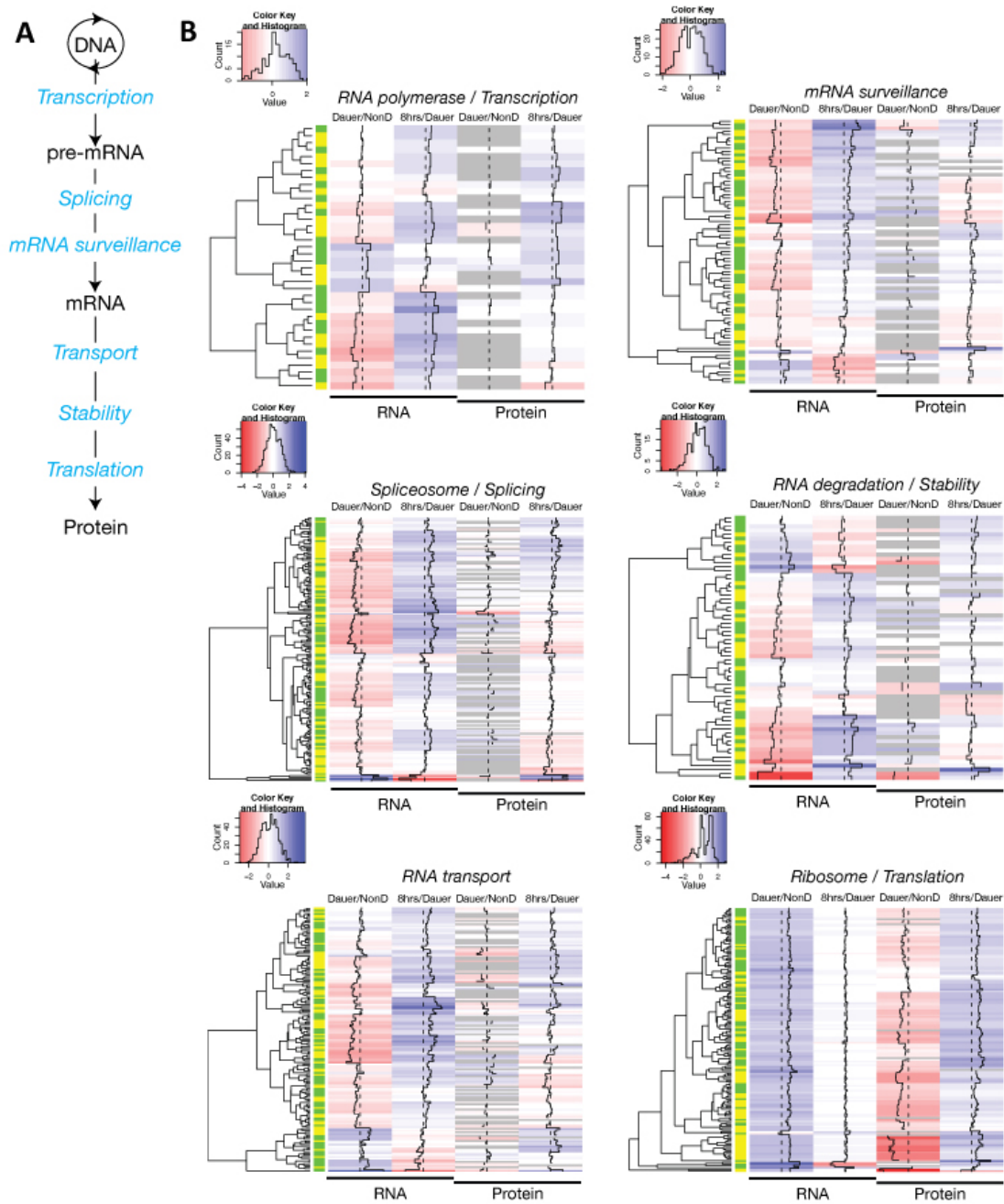


Abb. 3-15 Molekulare Signaturen des Dauerstadiums im genetischen Informationsfluss

A: Schematische Darstellung für den genetischen Informationsfluss von DNA nach Protein; B: Heatmaps von der eingeschätzten Fach-Veränderung (rot und blau) für sechs ausgewählte KEGG-Pathways; Die Zeilen mit einem gelben Etikett sind *C. elegans* Gene und die grünen Zeilen sind *C. briggsae* Gene.

3.2.7 Dauer-spezifische miRNA-Biogenese zur Steuerung der Genexpression

miRNAs fungieren als Regulatoren der posttranskriptionellen Genexpression durch Steuerung der RNA-Stabilität und translationalen Effizienz. Wir haben bereits eine deutliche Reduzierung der ribosomalen Proteine, die einer allgemeinen Reduktion der Übersetzung in Dauerlarven in vorherigen Abschnitten zugeschrieben wird, berichtet. Wir spekulieren, dass die Mechanismen zum Destabilisieren der mRNA in transkriptionell stillen Dauerlarven unterdrückt werden. Deshalb werden wir einen genaueren Blick auf die Veränderungen von mRNA- und Proteinmengen haben, die mit der miRNA-Biogenese und dem Abbau sowie der Target-Erkennung und Destabilisierung verbunden sind.

Abb. 3-16 zeigt eine schematische Übersicht über diese Prozesse und die Kartierung für die Ergebnisse der RNAseq. Auf der mRNA Ebene werden *drsh-1* (Drosha) und *pash-1* (Pascha) Gene jeweils bis zu ca. 0,125- und 0,4-fach in Dauerlarven (im Vergleich zu nicht-Dauer) herunterreguliert. Die beiden Genprodukte katalysieren den ersten Schritt im kanonischen miRNA-Biogenese-Pathway, in dem pri-miRNA zu pre-miRNA geschnitten wird. Die Larven im Daueraustritt regulieren die beiden Gene bis zu ca. 1,8-fach innerhalb von 8 Stunden nach der Induktion hoch. Leider wurden die beiden Proteine durch die LC-MS/MS nicht detektiert. Die Umwandlung von pre-miRNA in miRNA-Duplexe benötigt das *dcr-1* (Dicer) Genprodukt. Das mRNA Niveau von Dicer bleibt fast konstant in Dauer, wird aber beim Daueraustritt erhöht. Die Proteinmenge von Dicer steigt allerdings um mehr als das 8-Fache nach 8 Stunden ab Induktion des Daueraustritts. Wir vermuten, dass die neu synthetisierten miRNA Spezies parallel mit dem Dicer Protein beim Daueraustritt zunehmen. Die miRNA-spezifischen *C. elegans* Argonaut-Proteine ALG-1 und ALG-2 unterstützen die Spaltung des pre-miRNA Duplex-Strangs und packen die reifen miRNA in den miRNA-induzierten Silencing-Komplex ein. ALG-1 ist außer AIN-2 das einzige Protein, dessen Proteinmenge in Dauerlarven steigt. ALG-1 ist für die Dicer Spaltung erforderlich [Duchaine, et al., 2006] und dient auch als Komponente von miRNA-Effektor-Komplexen. ALG-2 spezifische Peptide wurden nicht in unserer Messung identifiziert. Einige Komponenten der miRNA-Effektor-Komplexe wie TSN-1 und VIG-1 werden auf der Proteinebene in Dauerlarven (im Vergleich zu nicht-Dauer) herunterreguliert. Dies gilt auch für die Komponenten des CCR4-NOT-Komplex, der bei mRNA Deadenylierung und Destabilisierung eine Rolle spielt [Kuzuoglu-Ozturk, et al., 2012]. Zum Beispiel sind die Proteinmengen von PAB-1 und NOT-1 in Dauerlarven (im Vergleich zu nicht-Dauer) herunterreguliert und beim Daueraustritt hochreguliert.

Der miRNA-Biogenese Pathway zeigt signifikant reduzierte RNA-Mengen in Dauerlarven. Dann steigen RNA-Mengen und Protein-Mengen beim Daueraustritt T=8 h. Zukünftige Studien werden den Nachweis erbringen, ob diese Regulation funktionell mit der Veränderung der mRNA Deadenylierung und Destabilisierung verbunden ist. Wir glauben, dass unsere Ergebnisse für zukünftige Studien des mRNA Metabolismus im Rahmen des Entwicklungsarrests eine neue Tür öffnen.

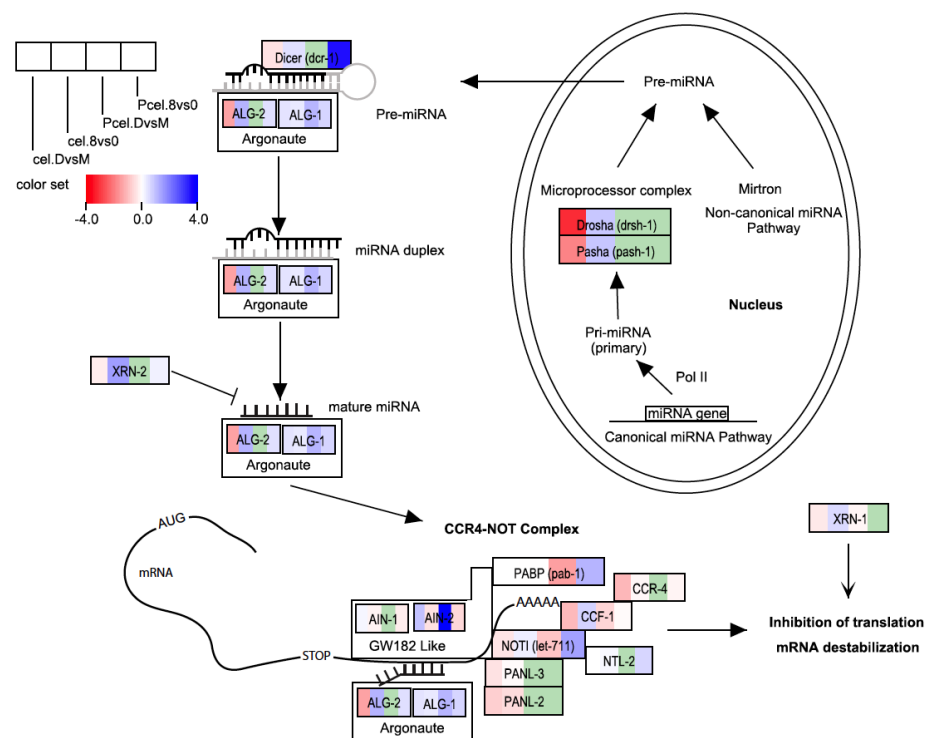


Abb. 3-16 Der Pathway der miRNA-Biogenese und Mapping mit RNA-seq und Protein-Daten

cel.DvsM und cel.8vs0: relative RNA-Mengenänderungen in Dauerlarven zu in nicht-Dauer Mix sowie in Proben beim Daueraustritt T=8 h zu beim Daueraustritt T=0 h. Pcel.DvsM und Pcel.8vs0: relative Protein-Mengenänderungen in verschiedenen Proben. Farbskala: rot, herunterreguliert; blau, hochreguliert; grün, nicht detektiert.

Unsere RNA-seq Ergebnisse wurden für einige Kandidaten auch durch qPCR überprüft. Wir verwendeten eine endogene Referenz *Cel-cdc-42* [Hoogewijs, et al., 2008] und zwei exogene Referenzen ERCC074 und ERCC130, die zwei Komponenten mit der gleichen Menge im Spike-In-Mix sind. Bei der relativen Quantifizierung wurde der Spike-In-Mix zu den Proben der Gesamt-RNA zugegeben und alle Proben mit ERCC130 normalisiert. Zwei exogene Referenzen zeigen in Abb. 3-17 eine sehr gute Korrelation. Es gibt einen großen Unterschied zwischen den

Ergebnisse von RNA-seq und qtPCR, aber eine gleiche Reihenfolge für die Menge von Genexpression, außer für *alg-2*. Die Ursache, die zu diesem Unterschied führt, ist wahrscheinlich die Normalisierungsmethode durch FPKM bei der RNA-seq Datenanalyse.

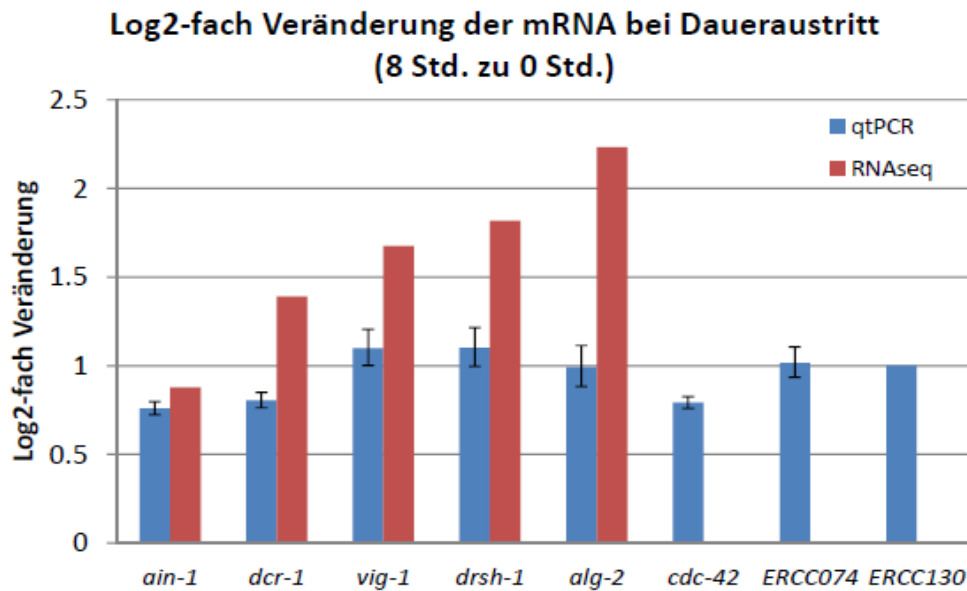


Abb. 3-17 Die relative mRNA-Mengenänderung für den Pathway von miRNA-Biogenese durch die Detektierung von qtPCR und RNA-seq

exogene Referenzen: ERCC074, ERCC130 (zwei Komponenten von Spike-In-Mix); endogene Referenz: *cel-cdc-42*

3.3 Dynamische Remodellierung vom Proteom beim Daueraustritt in *C. elegans*

3.3.1 Anstieg der Gesamt-RNA-Menge und Proteinmenge in *C. elegans* beim Daueraustritt

Da Dauerlarven fasten können, müssen sie entbehrlichen Energieverbrauch vermeiden und die Stoffwechselrate reduzieren [Wadsworth and Riddle, 1989]. Im Vergleich zu anderen Entwicklungsstadien geht die Rpo II Transkriptionsrate bei Dauerlarven auf 11-17% zurück [Dalley, et al., 1993]. Wenn das Nahrungsangebot in der Umgebung sich verbessert, wird der Austritt von Dauerlarven durch Nährstoff-Signale induziert. Es kommt zu einem Anstieg der Stoffwechselaktivität. Mit Hilfe eines BioSorters – eines Geräts der Durchflusszytometrie für große Partikel - wurden jeweils drei bis vier Replikate mit jeweils genau 3.000 Würmern von *C. elegans* Wildtyp N2 während des Daueraustritts T=0, 1, 2, 4, 8 und 16 h abgezählt und anschliessend Gesamt-RNA und Gesamt-Protein extrahiert (siehe 2.1.4 und 2.1.6). Die Probekonzentration wurden jeweils dreimal durch ein Qubit v2.0 Fluorometer gemessen.

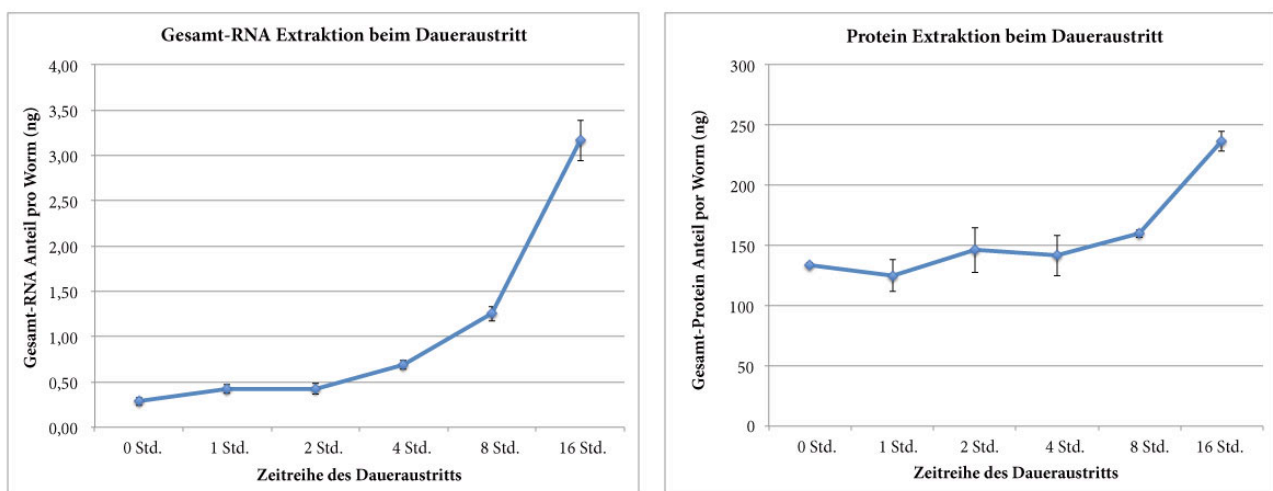


Abb. 3-18 Gesamt-RNA und Gesamt-Protein Anteil pro Wurm in *C. elegans* Proben beim Daueraustritt

Der Gesamt-RNA Anteil pro Wurm stieg um 50% und 143% zu Daueraustritt T=0 h auf 0,43 ng und 0,68 ng nach dem Ansetzen des Austritts nach einer und vier Stunden (Abb. 3-18). Nach unserer Beobachtung findet die Postdauer-Häutung zwischen zwölf und 16 Stunden statt. Nach acht Stunden - dem letzten Zeitpunkt vor der Häutung - stieg die Gesamt-RNA-Menge um 346% auf 1,25 ng pro Wurm. Die Gesamt-Protein Menge stieg nach acht Stunden nur lediglich um 19,5% zu Daueraustritt T=0 h. Dies deutet an, dass Abbau der alten Proteine beim Daueraustritt wahrscheinlich eine wichtige Rolle genau wie Proteinsynthese spielt. Diese Ergebnisse sind von

unserer Anreicherungsanalyse nach der funktionellen Annotation unterstützt. Wir haben beim Daueraustritt eine erhebliche Aktivitätserhöhung von Peptidase-Aktivität und eine Aktivitätsreduzierung von Peptidase-Inhibitor-Aktivität festgestellt (siehe 3.3.2). Die Wurmgröße und Wurmvolume beim Daueraustritt T=8 h sind optisch deutlich vergrößert im Vergleich zu den Proben von T=0 bis 4 h und die Wurmkörper sind lichtdurchlässig geworden.

Technisch ist es nicht möglich bei der Extraktion von Gesamt-RNA und Protein aus den Würmern eine Kontamination mit *E. coli* zu vermeiden. Die Anzahl der *E. coli* Peptide betrug weniger als 1% der identifizierten Peptide in allen Proben beim Daueraustritt (Abb. 3-19). Deswegen hat die Kontamination durch *E. coli* nur einen kleinen Einfluss auf unsere Ergebnisse. Wir versuchten durch qPCR in den Proben der Gesamt-RNA die Menge von *E.coli* 16s rRNA zu quantifizieren und rechneten die Anteile von *E.coli* RNA aus. Leider funktionierten die qPCR-Primer, die wir aus der Literatur ausgesucht haben, nicht gut.

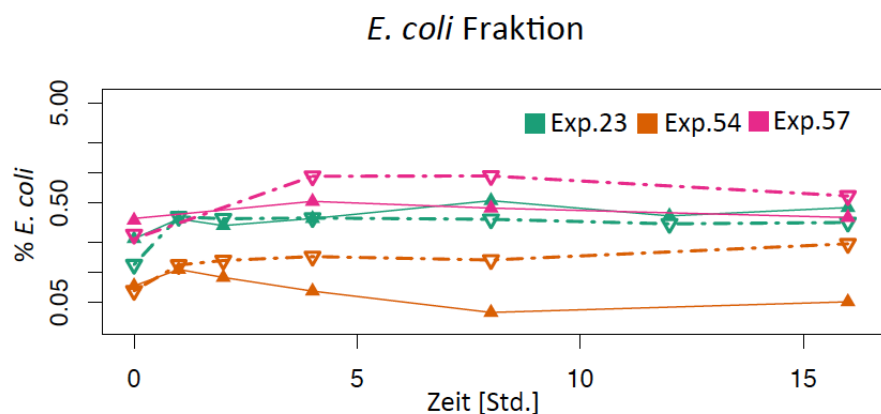


Abb. 3-19 *E.coli* Kontamination in drei *C. elegans* Proteom Datensätzen beim Daueraustritt

Die durchgezogenen Linien sind Summen der Intensität von *E.coli* Peptiden und die gestrichelten Linien sind die spektrale Zählung [Liu, et al., 2004].

3.3.2 Signifikante dynamische Veränderungen der Proteinmenge beim Daueraustritt

Die Wurmproben in dem Zeitreihen-Experiment wurden beim Daueraustritt für mehrere Zeitpunkte präpariert. Mittels Shotgun LC-MS/MS wurden 4.145 Proteingruppen im ersten biologischen Replikat (Exp. 23) identifiziert. Außer Exp.23 haben wir noch zwei weitere biologische Replikaten des label-freien Daueraustritt-Experiment (Exp. 54 und Exp. 57) gemessen und diese drei biologischen Replikate stimmen überein (Abb. 3-20). Wir analysieren in dieser Dissertation nur das Exp. 23.

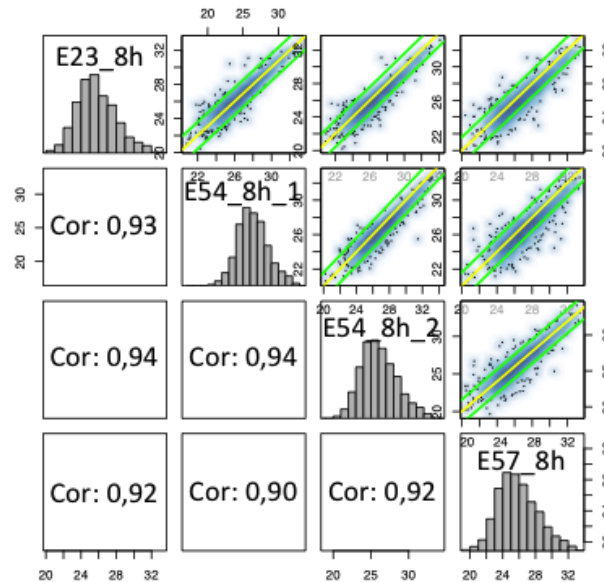


Abb. 3-20 Paarweise Korrelation von Peptid-Intensitäten der Proteingruppen in drei biologischen Replikaten für label-freies Daueraustritts-Experiment

Die Daten vom Daueraustritt T=8 h sind hier als ein Beispiel gezeigt. Exp. 23, Exp. 54_2 und Exp. 57 aus drei technischen Replikaten und Exp. 54_1 aus zwei technischen Replikaten (zwei Runden wurden für Exp_54 gemessen). Grüne Linien entsprechen einer dreifachen Veränderung. Die Werte auf der Achse sind log₂ LFQ-Intensität (*relative label-free quantification* mit MaxQuant)

Abb. 3-21 zeigt eine Heatmap von relativen Veränderungen (log₂ Fold-changes) jeder Proteingruppe beim Daueraustritt in Exp. 23 (zu Daueraustritt T=0 h als Referenz). Wir teilen gemäß ihrer zeitlich relativen Veränderungen alle Proteingruppen in neun Cluster auf. Die relativen Veränderungen aller Proteingruppen im Cluster 1 bleiben beim Daueraustritt und in L4 konstant. Der Cluster 2 enthält die dauer-angereicherten Proteine, deren Menge sich beim Daueraustritt verringert (Abb. 3-21-A). Im Gegensatz dazu existierten im Cluster 4 und 6 die Proteine, deren Menge beim Daueraustritt immer steigt (Abb. 3-22-B, andere Cluster siehe im Anhang Abb. S-1).

Die funktionelle Annotation wurde durch DAVID [Huang da, et al., 2009] für alle neun Gruppen durchgeführt. Die folgenden Parameter wurden bei DAVID für die funktionelle Anreicherung ausgewählt. Die ausgewählten Datenbanken sind SP_PIR_Keywords (Functional_Categories); Goterterm_BP_FAT, Goterterm_CC_FAT, Goterterm_MF_FAT (Gene_ontology); KEGG_Pathway (Pathways); Interpro, Smart (Protein_domains) mit der Abgrenzung für p-Werte < 0,05 und der mittel-strengen Klassifizierung (voreingestellt). Diese Klassifizierung bei DAVID verwendet die Kappa Statistik und bestimmt quantitativ die Ähnlichkeit der Kategorien für die funktionelle Annotation. Die eng verwandten Kategorien werden in denselben Annotationsgruppen aufgelistet

und die biologische Signifikanz der Annotationsgruppe wird mit dem *Enrichment Score* ausgewertet. Der Wert vom *Enrichment Score* ist der negative Logarithmus zur Basis zehn des geometrischen Mittels der p-Werte aller Kategorien in derselben Annotationsgruppe. Je höher der *Enrichment Score* ist, desto signifikanter die Annotation.

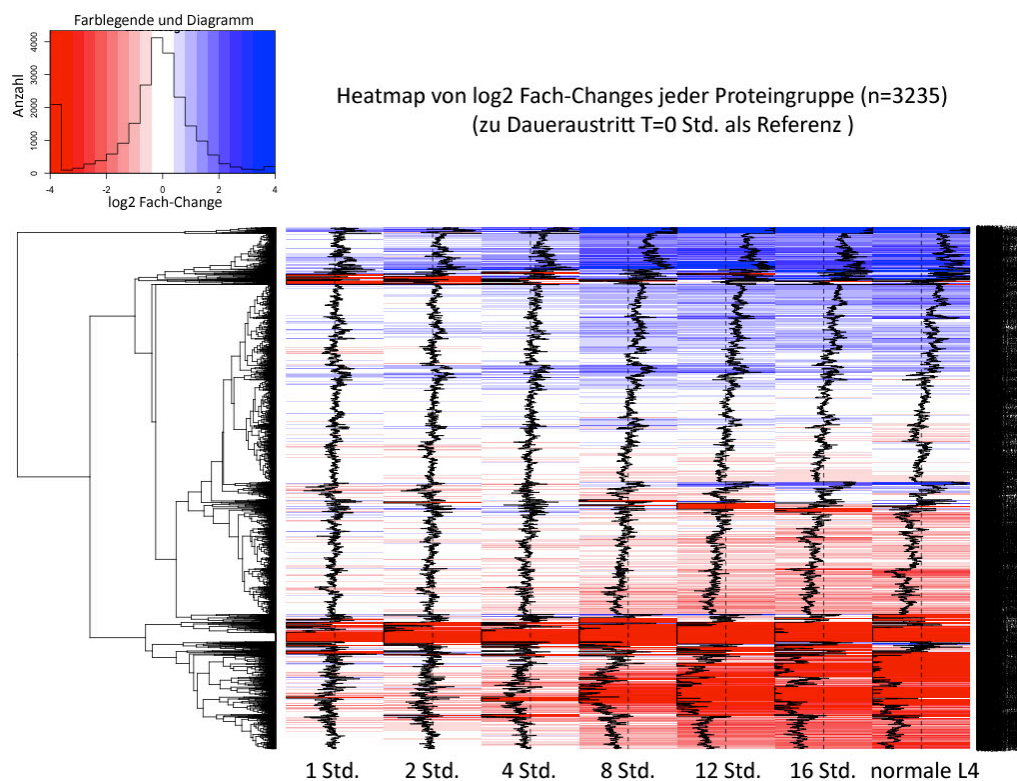


Abb. 3-21 Heatmap für die relative Veränderung der Proteinmenge beim Daueraustritt in Exp. 23

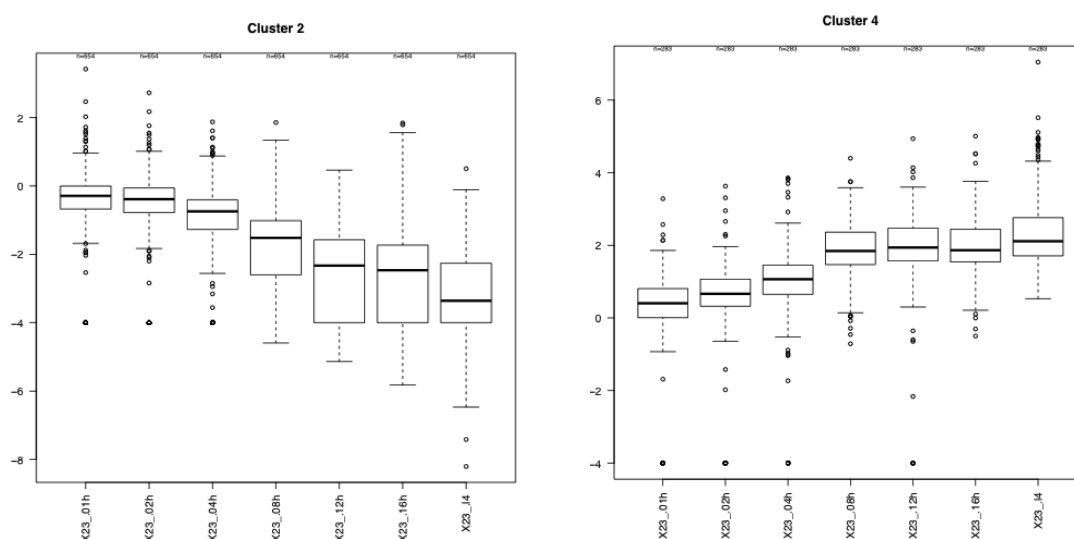


Abb. 3-22 Boxplots für die relative Protein-Mengenänderung beim Daueraustritt in Exp. 23

Cluster 2: Proteine mit reduzierter Menge beim Daueraustritt (n=654); Cluster 4: Proteine mit erhöhter Menge (n=283); Andere Cluster siehe Anhang (Abb. S-1). X-Achse: Zeitreihe des Daueraustritt; Y-Achse: log2 Fachchange

Im Cluster 2 haben wir 654 Proteingruppen, die 1.073 Proteine repräsentieren, klassifiziert. Insgesamt sind 912 Proteine in 639 Proteingruppen bei DAVID funktionell annotiert und damit in 23 signifikanten Annotationsgruppen und 24 ungruppierten, aber auch signifikanten einzelnen Kategorien sortiert. In Abb. 3-23 werden die zehn signifikanteste Annotationsgruppen im Cluster 2 als die dauer-angereicherten Gruppen dargestellt.

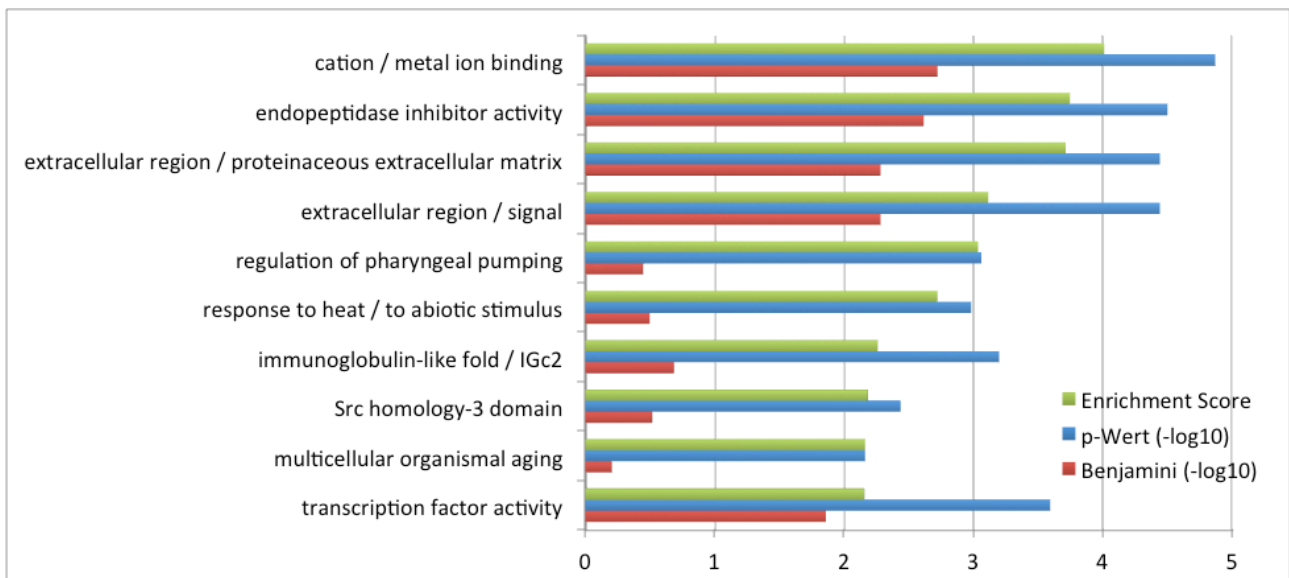


Abb. 3-23 Die Anreicherung nach der funktionellen Annotation durch DAVID für die Proteine in Cluster 2

Grün: *Enrichment Score* für die Annotationsgruppe, Blau: der negative dekadische Logarithmus des kleinsten p-Werts von der annotierter Kategorie in der Gruppe, Braun: der negative dekadische Logarithmus des kleinsten Benjamini-Werts von der annotierter Kategorie in der Gruppe.

Die höchste Signifikanz hat die Annotationsgruppe *cation/metal ion binding*, die 97 Proteine enthält. Darin wurden insgesamt 46 Proteine mit Zink-Ionenbindung, 21 mit Eisen-Ionenbindung, zehn mit Magnesium-Ionenbindung, zwölf mit Calcium-Ionenbindung, sechs mit Mangan- Ionenbindung und vier mit Kupfer-Ionenbindung gefunden. Metall-Ionen bindende Proteine spielen eine wichtige Rolle in biologischen Prozessen. Metallionen können die Proteinstruktur stabilisieren und induzieren Konformationsänderungen und sie sind auch manchmal Teil des aktiven Zentrums eines Enzyms. Zum Beispiel nehmen Zinkfingerproteine durch den Einbau des Zinkatoms eine schleifenförmige Struktur (sog. Zinkfinger) ein, welche spezifisch mit der DNA oder RNA interagieren kann (Thiel, G. & Lietz, M. 2004). DAF-12, das in 3.1 beschrieben wurde, ist ein nukleärer Hormonrezeptor mit Zinkfinger-Domäne und steht auch in dieser Annotationsgruppe. 14

Proteine in der Kategorie *iron ion binding* gehören zu der Kategorie *heme binding*, die acht Proteine der *Cytochrome 450 superfamilie*, drei *Katalasen* und zwei *Globine* enthalten. Cytochrom 450 ist ein Hämprotein, das die Oxidation von organischen Substanzen katalysieren kann. Als Substrate fungieren sowohl die körpereigenen Zwischenformen (z.B. Lipide, Steroidhormone), als auch körperfremde Substanzen (z.B. Arzneimittel, andere toxische Chemikalien) zur Entgiftung [Guengerich, 2007]. Katalase kann Wasserstoffperoxid, das als Nebenprodukt im Metabolismus entsteht, zu Sauerstoff und Wasser umsetzen. Dadurch wird die Schädigung von DNA und Proteinen vermieden.

In der Annotationsgruppe *Endopeptidase inhibitor activity* haben wir zwölf Proteine gefunden. Sieben davon gehören zur Untergruppe *Serine-type endopeptidase inhibitor activity* und drei davon gehören zur Untergruppe *Cysteine-type endopeptidase inhibitor activity*.

Wir fanden 36 Proteine in der Kategorie *Signal*, die 28 Glykoproteine und 16 sezernierte Proteine enthält. Hier haben wir den Typ-II Rezeptor von TGF- β -like Signalwege DAF-4 (C05D2.1) und den Ligand DAF-7 (B0412.2) gefunden. DAF-4 ist reduziert in den Proben von Daueraustritt T=1, 2 und 4 h. Es ist in T=8, 12 und 16 h sowie in L4-Larven nicht auffindbar. DAF-7 ist in den Proben von Daueraustritt T=1 und 4 h hoch exprimiert, in T=2, 8 und 16 h herunterreguliert und in 12 h oder in L4-Larven nicht identifiziert. Es ist auch interessant, dass alle vier Proteine mit Kupfer-Ionenbindung sich in dieser Kategorie befinden (DIG-1, F21F3.1, SOD-1 und TYR-3). Die Proteine in den Annotationsgruppen *Sh3 domain* und *IGc2* fungieren auch bei intrazellulärer Signaltransduktion, Zell-Zell-Erkennung und Protein-Protein-Interaktion [Mayer and Baltimore, 1993; Teichmann and Chothia, 2000].

Die Kategorie *Regulation of pharyngeal pumping/feeding behavior* ist ein Begriff der Gene Ontologie. Sieben Proteine werden in diese Kategorie angereichert. Drei Proteine davon (GPB-2, EAT-16, EGL-8) sind die Komponenten der Kategorie *Dopamine receptor signaling pathway*. Der Dopamin Signalweg ermöglicht es *C. elegans* auf Veränderungen in der Umgebung durch die Modellierung ihres Fortbewegungsverhaltens (z.B. Erfahrung oder Erinnerung) zu reagieren [Sawin, et al., 2000]. EGL-8 und GPB-2 werden zur Zeit als neuer Regulator für die Dauerbildung in *C. elegans* untersucht [Shih, H. International Worm Meeting 2013; Pollok, R International Worm Meeting 2011].

In der Kategorie *Response to heat* sind neun Proteine angereichert: HSP-25 (C09B8.6), HSP-43 (C14F11.5), HSP-16.1 (T27E4.2), HSP-16.11 (T27E4.8), HSP-16.2 (Y46H3A.3), HSP-12.3

(F38E11.1), SIP-1 (F43D9.4), MTL-1 (K11G9.6), Y55F3BR.6. Außer MTL-1 gehören andere acht Proteine zu der kleinen Hitzeschockprotein-Familie HSP20. In die Kategorie *Response to abiotic stimulus* werden zwölf Proteine angereichert: die neun Proteine die eben genannt wurden und GRK-2 (W02B3.2), MEC-5 (E03G2.3), MEC-7 (ZK154.3). MEC-5 und MEC-7 sind für die mechanosensorischen Neuronen erforderlich. GRK-2 kodiert eine Serin/Threonin Kinase und ist für die chemosensorischen Neuronen erforderlich.

Die neunte signifikante Annotationsgruppe ist die Kategorie *Multicellular organismal aging*. Insgesamt wurden 29 Alters-Proteine im Cluster 2 gefunden. Acht Proteine davon gehören zur Kategorie *Response to temperature stimulus/Oxidative stress*. Es gibt fünf Oxidoreduktasen: CTL-1, CTL-2, SOD-3 (C08A9.1), SODH-1 (K12G11.3), SODH-2 (K12G11.4). 38% dieser Alters-Proteine (elf Proteine) haben durch alternatives Spleißen die Protein-Isoformen: AKT-1 (C12D8.10), AAK-2 (T01C8.1), EGL-4 (F55A8.2), IFB-1 (F10C1.2), LET-363 (B0261.2), DAF-16 (R13H8.1), EMB-9 (K04H4.1), APL-1 (T11B7.4), EAT-16 (C16C2.2), NTL-2 (B0286.4), RNH-1.0 (F59A6.6). Das Verhältnis ist ein bisschen höher als die der durchschnittlichen Werte vom Cluster 2 (ca. 30%). Hier gibt es acht Downstream-Gene von DAF-16 (SIP-1, SOD-3, SODH-1, SODH-2, MTL-1, CTL-1, CTL-2 und DOD-18(C54G4.6)). CLK-1(ZC395.2) ist eine hoch konservierte Demethoxyubichinon (DMQ) Mono-Oxygenase, die für die Biosynthese von Ubichinon (Coenzym Q9, CoQ9) erforderlich ist. CoQ ist ein Elektronen- und Protonen-Überträger in der Atmungskette von Mitochondrien. In *C. elegans* zeigt der Mutant mit CLK-1 Funktionsverlust eine verminderte Fertilität, langsame Bewegung und lange Lebensdauer, die durch die Zugabe von exogenem CoQ10 restauriert werden kann [Takahashi, et al., 2012]. Frühere Studien deuten an, dass der CoQ-Vorläufer DMQ sich im *clk-1* Mutant akkumuliert und DMQ wahrscheinlich eine bessere antioxidative Aktivität als CoQ hat. Damit führt die Reduzierung der reaktiven Sauerstoffspezies im *clk-1* Mutant zur langen Lebensdauer für Würmer [Kayser, et al., 2004; Miyadera, et al., 2002]. CLK-1 wird als COQ-7 bezeichnet und ist in Dauerlarven hoch exprimiert und beim Daueraustritt herunterreguliert. Die Kategorie *Oxygen and reactive oxygen species metabolic process* ist auch im Cluster 2 angereichert. Andere COQ-Proteine (COQ-8, C35D10.4) sind in Cluster 4 und 6 zu sehen und sie sind beim Daueraustritt hochreguliert [Asencio, et al., 2009].

21 Proteine gehören zu der Kategorie *Regulation of transcription* unter der Annotationsgruppe *transcription factor activity*. Zehn Proteine davon sind Transkriptionsfaktoren: DAF-12, DAF-16, CRH-1 (Y41C4A.4), DVE-1 (ZK1193.5), EFL-1 (Y102A5C.18), FKH-7 (F26D12.1), NHR-246

(ZK1037.4), STA-1 (Y51H4A.17), STA-2 (F58E6.1) und AQP-4 (F40F9.9). *sta-1* kodiert einen Transkriptionsfaktor der STAT-Familie. Die STA-1 Mutante zeigte einen synthetischen Dauer Phänotyp mit ausgewählten TGF- β -Mutationen [Patterson, et al., 1997]. Die Funktion von STA-1 benötigt DAF-1 und DAF-8 und ist abhängig von DAF-3. Sie formen eine negative Feedback-Schleife im DAF-7/TGF- β -like Signalweg [Wang and Levy, 2006]. STA-2 spielt eine spezifische Rolle bei Aktivierung der Expression von den antimikrobiellen Peptiden in der Epidermis von *C. elegans* [Dierking, et al., 2011]. Die Funktion von FKH-7 in *C. elegans* ist noch nicht bekannt. Es ist nur in Neuronen von Kopf- und Schwanzganglien sowie im Nervenstrang [Hope, et al., 2003] exprimiert. *crh-1* kodiert ein CREB-homologes Protein (*cAMP-response element binding protein*). CRH-1 ist im Zellkern lokalisiert und beteiligt sich an der Transkription von CRE-Sequenz-abhängigen Genen durch die Aktivierung der CaM-Kinase Kaskade [Kimura, et al., 2002] und auch an den Signalwegen von Octopamine [Suo, et al., 2006] und Serotonin [Zubenko, et al., 2009]. CRH-1 ist wahrscheinlich eine Komponente der chemosensorischen Kaskade zur Regulierung des TGF- β -Signalwegs und ist für die Dauerbildung erforderlich [Alkema and Horvitz, International *C. elegans* Meeting 2001, European Worm Meeting 2002]. EFL-1 ist für die embryonale Asymmetrie und negative Regulierung von Ras/MAPK erforderlich [Ceol and Horvitz, 2001; Page, et al., 2001]. Es reguliert auch negativ die Entwicklung der Vulva [Tischler, et al., 2006] und den Übergang von der G1- zur S-Phase im Zellzyklus [Boxem and van den Heuvel, 2002].

Es gibt noch andere interessante Kategorien und ungruppierte Terme im Cluster 2 z.B. *Glucose/ribitol dehydrogenase*, *Lysosome* und *Antioxidative activity*. Außerdem sind die Terme *Myofibril assembly*, *Muscle contraction*, *LIM-Domain* und *Cytoskeletal protein binding* auch beim Daueraustritt herunterreguliert. Die Proteine unter diesen vier Termen spielen wichtige Rollen bei der Rekonstruktion der Kutikula in Dauerlarven. Die Kategorie *Bromodomain* ist eine konservierte Proteindomäne um acetylierte Lysinreste spezifisch zu erkennen, z.B. den N-Terminus von Histonen [Owen, et al., 2000]. Sie fungiert als ein kritischer Mechanismus für die Regulation von Protein-Protein-Interaktion im Chromatin-Remodeling und transkriptioneller Aktivierung [Zeng and Zhou, 2002]. 18 Proteine wurden unter dem Term *Transthyretin-like* gefunden, die als eine nematoden-spezifische, neue Proteinfamilie definiert wurde. Diese Proteinfamilie ist schwach ähnlich mit Prealbumin, das Schilddrüsenhormone transportiert. Seine spezifische Funktion ist unbekannt. Insbesondere wurden drei Schlafähnliche-Proteine gefunden: EGL-4 (F55A8.2), PDE-4 (R153.1) und ACY-1 (F17C8.1). Zurzeit werden nur diese drei Proteine in *C. elegans* als Schlaf-bezogene Proteine definiert.

In Cluster 4 und 6 haben wir insgesamt 322 Proteingruppen, die 452 Proteine repräsentieren, klassifiziert. 379 Proteine in 309 Proteingruppen sind bei DAVID funktionell annotiert und 17 signifikanten Annotationsgruppen und 33 ungruppierten, aber signifikanten einzelnen Kategorien zugeordnet. In Abb. 3-24 werden die zehn signifikantesten Annotationsgruppen dargestellt.

Die Proteine der Cluster 4 und 6 sind in den Kategorien für die positive Regulation von Wachstum und Entwicklung angereichert, z.B. die dominant signifikanten *Ribosomal protein* und *Embryonal development/Larval development*. Wir haben in 3.2.5 die Veränderung der ribosomalen Proteine beschrieben. Des weiteren hängen 21 Proteine mit dem *Molting cycle* zusammen, z.B. MLT-7 (ZK430.8), MLT-11 (W01F3.3), NOAH-1 (C34G6.6) und NOAH-2 (F52B11.3).

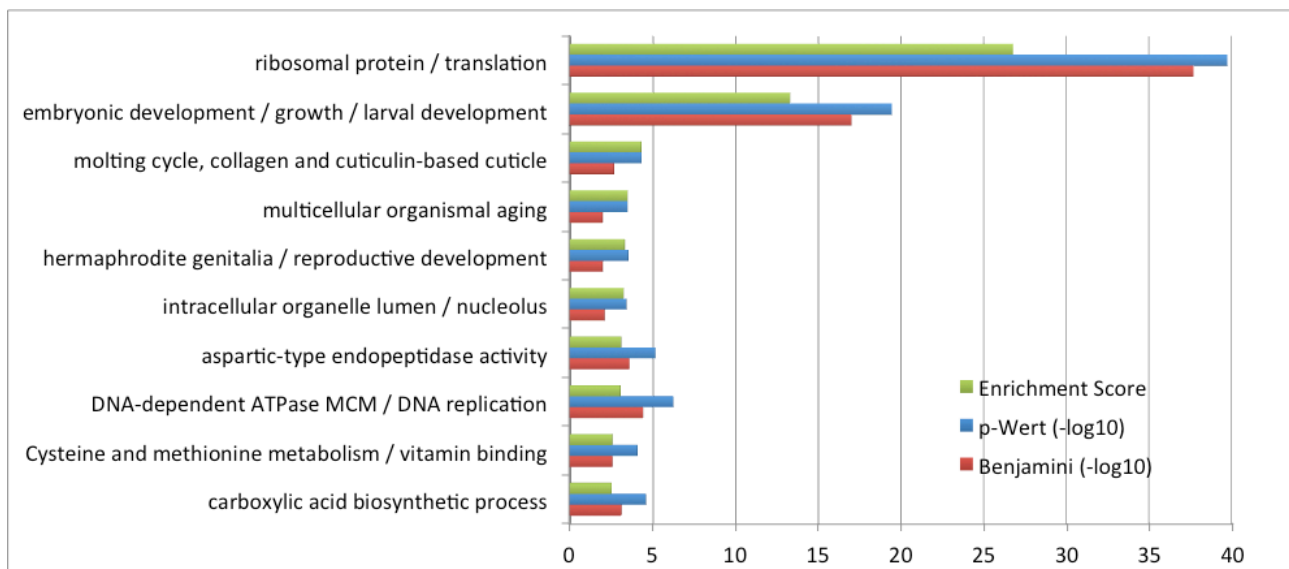


Abb. 3-24 Die Anreicherung nach der funktionellen Annotation durch DAVID für Cluster 4 und 6

Wir haben auch in der Kategorie *Multicellular organismal aging* 18 Proteine gefunden. Die meisten sind Untereinheiten von ribosomalen Proteinen. Außerdem gibt es noch die Alters-Proteine wie DAO-5 (C25A1.10), FKB-3 (C05C8.3), COQ-8 (C35D10.4) usw. Für DAO-5 ist ein nukleolares Phosphoprotein vorhergesagt. Es ist lokalisiert in Nukleolen und spielt eine Rolle für die Transkription der rRNA Gene und für die Organisation der nukleolären Struktur [Yu and Larsen, 2001]. DAO-5 wurde als ein nicht-ribosomaler nukleolärer Marker zum Nachverfolgen der Nucleologenese bei der Entwicklung in *C. elegans* verwendet [Korcekova, et al., 2012]. *dao-5* mRNA ist durch den Insulin-like Pathway herunterreguliert und in Dauerlarven sehr hoch exprimiert [Yu and Larsen, 2001]. FKB-3 wurde früher DAO-1 genannt. *fkf-3* kodiert Peptidyl-Prolyl-cis-trans-

Isomerasen (PPIasen) zur Proteinfaltung und ist homolog zum Säugetier FK506 Immunosuppressant-Bindungs-Protein-9. *fkf-3* mRNA ist durch den Insulin-like Pathway hochreguliert [Yu and Larsen, 2001]. Wir haben durch RNAseq die gleichen Ergebnisse erhalten (log2FC *dao-5*: Dauer zu nicht-Dauer 1,00412, kein Ergebnis beim Daueraustritt T=8 zu 0 h; log2FC *fkf-3*: Dauer zu nicht-Dauer -1,56421, Daueraustritt T=8 zu 0 h 3,71085). Auf der Proteinebene steigt DAO-5 stabil beim Daueraustritt. Die Proteinmenge von FKB-3 ist für den Daueraustritt T=1 h und 4 h ähnlich wie T= 0 h, aber steigt in T=2 h und 8 h und ist extrem hoch für den Daueraustritt T=12 h, 16 h und L4 Larven. Die Funktion von FKB-3 in *C. elegans* ist noch unbekannt. Es hat eine Sequenz zur Retention im endoplasmatischen Retikulum und ist in der Exoskelett-synthetisierenden Hypodermis exprimiert mit Transkriptionspeaks, die den Zyklen der Häutung und Kollagen-Synthese entsprechen [Winter, et al., 2007]. Ubichinon reguliert die Alterung in *C. elegans* und der Mangel von Ubichinon in Menschen führt auch zu einer Vielzahl von Krankheiten. COQ-8 ist für die CoQ9 Biosynthese und eine kurze Lebensdauer erforderlich [Asencio, et al., 2009] und ist ortholog zu COQ8 in *S. cerevisiae* und UbiB in *E. coli*. Die *coq-8* Mutante hat ein langsames Pharyngeal-Pumping und die RNAi zeigte eine Reduzierung von CoQ9 und Superoxid sowie eine ungewöhnlich lange Lebensdauer [Asencio, et al., 2009; Asencio, et al., 2003]. Die *coq-8* Mutante kann nicht durch die Fütterung von exogenem CoQ10 gerettet werden [Asencio, et al., 2009]. In unserem Experiment steigt die Proteinmenge von COQ-8 schon beim Daueraustritt T=1 h und blieb auf hohem Niveau bis T=16 h und auch in L4 Larven. PEPT-1 (K04E7.2) ist ein Proton-gekoppelter intestinaler Oligopeptid-Transporter zur Aufnahme der Aminosäuren in Form von Di- und Tripeptiden. Er ist für die normale Entwicklung, Wachstum und Fortpflanzung durch DAF-2/Insulin- und LET-363/TOR-Signaltransduktionswege [Spanier, et al., 2009; Spanier, et al., 2010; Walker, et al., 2005] nötig.

42 Proteine sind in der Kategorie *Hermaphrodite genitalia development* (einschl. *Sex differentiation* und *Reproductive developmental process*) angereichert, z.B. SKR-2 (F46A9.4), LET-716 (C16A3.3), PRO-3 (Y39B6A.14), RACK-1 (K04D7.1) und NST-1 (K01C8.9). Außerdem gibt es noch weitere interessante Komponenten. LARP-1(R144.7) ist ein RNA-Bindung-Protein mit einem LA-Motiv (eine antike RNA-Bindungs-Domäne) und einer konservierten LARP1 Domäne. LARP-1 beeinflusst die Oogenese durch die negative Regulierung des Ras-MAPK Signalweges [Nykamp, et al., 2008; Zanin, et al., 2010]. *prg-1* (D2030.6) kodiert eines von zwei hochkonservierten *C. elegans* Argonaut/Piwi-Proteinen. PRG-1 ist wesentlich für die Gametogenese, normale Fruchtbarkeit, Akkumulation der piRNAs und Expression der kleinen RNAs in der Keimbahn. PRG-1 ist lokalisiert auf P Granulat während der Entwicklung [Batista, et al., 2008; Das, et al., 2008; Wang and

Reinke, 2008]. PAB-1 (Y106G6H.2) ist ein Poly(A)-Bindungsprotein. Es ist für die Proliferation der Keimbahn, die Regulierung der adulten Lebensdauer und für die normale Körpergröße erforderlich [Karlin, et al., 2002]. PAB-1 wurde als transgenes Reagenz mit dem Epitop für die Gewebespezifische mRNA-Isolierung verwendet [Kunitomo, et al., 2005]. Dabei haben wir auch viele Proteine für die DNA Replikation und Helikase gefunden.

Die GO-Kategorie der zellulären Komponenten *Intracellular organelle lumen* ist auch hier angereichert. Zehn Proteine befinden sich jeweils im Zellkern (fünf Proteine), im Mitochondrium (drei Proteine) und im Endoplasmatischen Reticulum (zwei Proteine). Die Kategorie *Aspartic-type endopeptidase* ist eine der sechs Gruppen von Proteasen, die nach den aktiven Zentren klassifiziert sind [Rawlings, et al., 2010]. Aspartatproteasen spalten die Peptidbindungen durch Hydrolyse mit der Hilfe von zwei hoch konservierten Aspartatresten [Suguna, et al., 1987]. Es gibt dafür den spezifischen Inhibitor Pepstatin [Umezawa, et al., 1970]. In Cluster 4 und 6 wird auch die Kategorie *Serine-type peptidase activity* signifikant angereichert. Diese Ergebnisse entsprechen unseren Ergebnissen in Cluster 2, dass *Endopeptidase inhibitor activity* beim Daueraustritt herunterreguliert wird.

MCM (minichromosome maintenance) ist die DNA-abhängige ATPase, die in Eukaryoten auch zur Initiation und Elongation der Replikationsgabeln erforderlich ist [Cortez, et al., 2004]. Die eng verwandte Kategorie AAA wird hier angereichert. AAA ist die Abkürzung für die mit vielen zellulären Aktivitäten assoziierten ATPasen. Die Proteine in dieser Anreicherungsgruppe sind mit dem biologischen Prozess von DNA-Replikation verbunden.

Auf dem KEGG-Pathway *Cysteine and methionine metabolism* sind neun Proteine angereichert. Darauf werden die Schlüsselenzyme zur Synthese von L-Serin, L-Cystein, L-Methionin sowie dem Nebenprodukt Adenin hochreguliert, z.B. Methionin Synthase METR-1(R03D7.1), Cystathionin Gamma-Lyase CBL-1 (C12C8.2), CTH-1 (F22B8.6) und CTH-2 (ZK1127.10) sowie B0228.7. In dieser Annotationsgruppe werden zwölf Proteine mit Vitamin-Bindung angereichert. Sechs davon haben Vitamin B6-Bindung. Die Proteine in der Kategorien *Carboxylic acid biosynthetic process* (einschließlich *Organic acid biosynthetic process* und *Organic acid biosynthetic process*) und *Protein biosynthesis* sind ebenfalls in Cluster 4 und 6 zu finden. Für die ungruppierten Kategorien werden Terme wie *Hydrolase* und *RNA-binding* signifikant angereichert.

Die Anreicherung wurde für alle neun Cluster durchgeführt. Aber die biologischen Bedeutungen in anderen Clustern sind nicht so signifikant wie in Cluster 2, 4 und 6.

3.3.3 Monitoring der Proteinsynthese beim Daueraustritt durch pSILAC

Durch die label-freien Experimente haben wir die relativen Veränderungen der Proteinmengen für jede Proteingruppe ausgewertet. Diese Veränderungen der Mengen sind auf das dynamische Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und -abbau zurückzuführen. Wir führten dann beim Daueraustritt ein pSILAC-Experiment durch (siehe 2.1.3) und werteten die *de novo* Proteinsynthese mittels der Signalintensitäten von leichten und schweren Peptiden aus. Durch pSILAC haben wir im Experiment 70 beim Daueraustritt T=0, 1, 2, 4, 8 und 16 h insgesamt 2.698 Proteingruppen identifiziert, die zumindest zu einem Zeitpunkt gefunden wurden. In den biologischen Replikaten (Experiment 86) für T=0, 2, 4, 8 und 16 h haben wir insgesamt 4.043 Proteingruppen identifiziert. Die biologischen Replikate sind stark korreliert mit einem Korrelationskoeffizient von 0,87 (Abb. 3-25). Im Rahmen dieser Dissertation werden wir die Analyse auf Exp. 70 fokussieren.

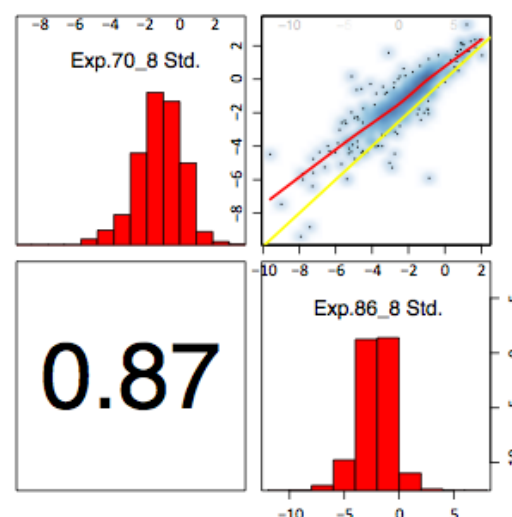


Abb. 3-25 Paarweise Korrelation der H/L-Verhältnisse für die Proben beim Daueraustritt T=8 h zwischen zwei biologischen Replikaten im pSILAC Experiment

H/L-Verhältnisse: Verhältnisse der Intensitäten von schweren und leichten Peptiden. Der Korrelationskoeffizient ist 0,87. Die Ergebnisse für andere Zeitpunkte werden nicht gezeigt.

Die Proteine, die durch die Peptide im schweren Kanal von Daueraustritt Proben identifiziert wurden, werden als neu synthetisierte Proteine angesehen. Durch die label-freien Experimente fanden wir immense Unterschiede auf mRNA- und Proteinebene zwischen der Probe T=8 h und T=0 h. Deswegen haben wir die neu synthetisierten Proteine beim Daueraustritt T=8 h funktionell angereichert (Abb. 3-26). In den Proben beim Daueraustritt T=8 h haben wir nach Entfernung von Kontaminationen 1.168 Proteingruppen detektiert (nur für Exp.70) und dann durch DAVID mit

den gleichen Parametern wie im label-freien Experiment die funktionelle Anreicherung durchgeführt. Insgesamt wurden 1.190 Proteine annotiert und in 21 signifikante Annotationsgruppen und 37 ungruppierte Kategorien einsortiert. In Abb. 3-27 werden die Top-Annotationsgruppen (*Enrichment Score* ≥ 2 ; Benjamini-Werte $\leq 0,05$) dargestellt.

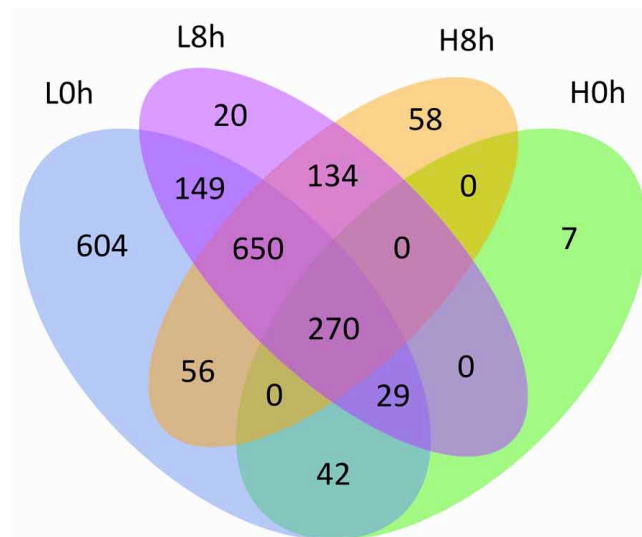


Abb. 3-26 Die identifizierten leichten und schweren Proteingruppen der Proben beim Daueraustritt T=0 h und T=8 h

L0h: leichte Proteingruppen beim Daueraustritt T=0 h; H8h: schwere Proteingruppen beim Daueraustritt T=8 h.

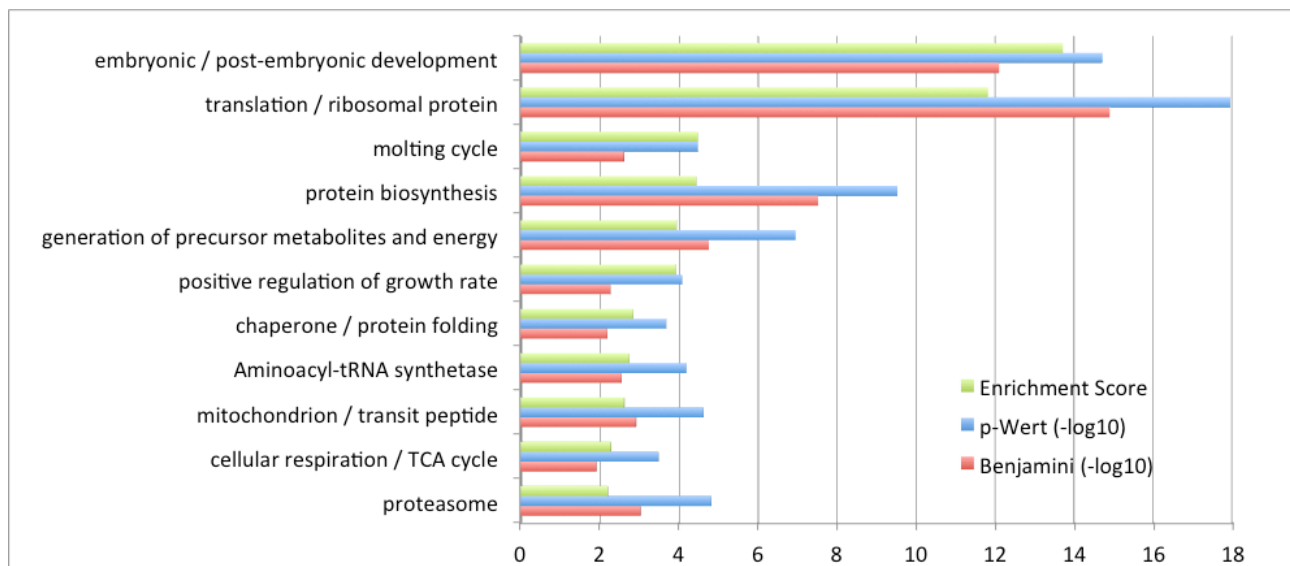


Abb. 3-27 Die Anreicherung von neu synthetisierten Proteinen der pSILAC-Proben beim Daueraustritt T=8 h nach der funktionellen Annotation durch DAVID

Als Top-Gruppen werden die Annotationsgruppen mit *Enrichment Score* größer als 2 und den Benjamini-Werten kleiner als 0,05 dargestellt.

Die Proteingruppen wurden dann gemäß ihren zeitlich relativen Veränderungen der Intensitätsverhältnisse zwischen schweren und leichten Peptiden (H/L-Verhältnisse) beim Daueraustritt von T=0 h bis T=8 h in sechs Cluster aufgeteilt. Dabei existieren insgesamt 674 Proteingruppen, deren H/L-Verhältnisse zumindest in drei Zeitpunkten festgestellt werden können. Die Veränderungsraten der H/L-Verhältnisse beim Daueraustritt stellen grundsätzlich die Geschwindigkeit von Proteinbiosynthese und -abbau dar. Je höher diese Rate ist, desto aktiver der Proteinmetabolismus. In den Clustern 1, 3 und 5 steigen die H/L-Verhältnisse immer ab der ersten Stunde nach Induzierung des Daueraustritts mit den verschiedenen Geschwindigkeiten (Abb. 3-28). In diesen drei Clustern befinden sich 634 Proteingruppen. Wir führten dazu auch die funktionelle Anreicherung mit DAVID durch. 657 annotierte Proteine wurden in 20 Annotationsgruppen und 45 ungruppierte Gruppen sortiert. Abb. 3-29 zeigt die Top-Annotationsgruppen (*Enrichment Score* ≥ 2 ; Benjamini-Werte $\leq 0,05$).

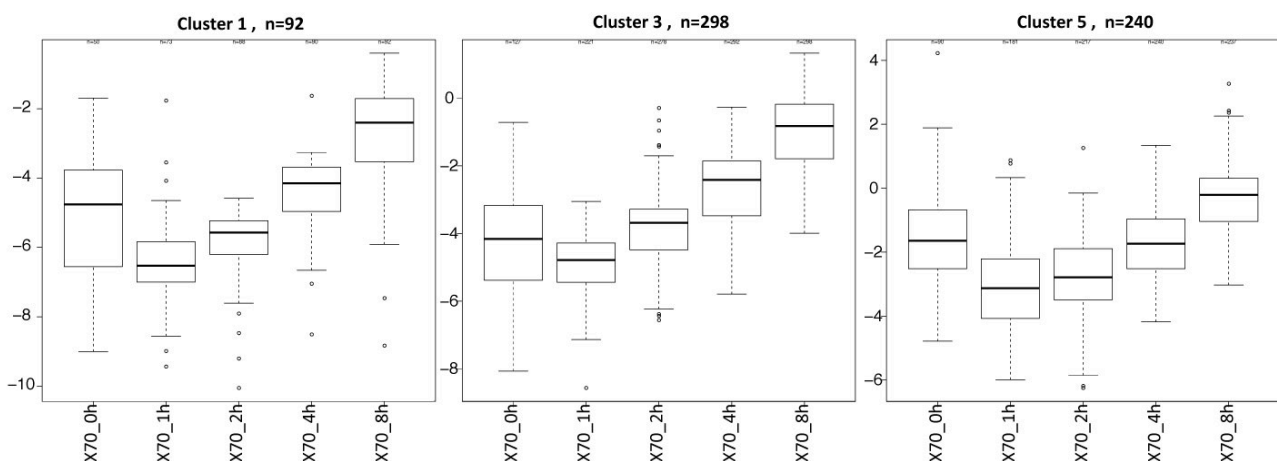


Abb. 3-28 Boxplots für die Cluster aus H/L-Verhältnissen beim Daueraustritt von T=0 bis 8 h in Exp. 70

X-Achse: Zeitreihe des Daueraustritts; Y-Achse: log₂ Foldchange; n: größte Anzahl der Proteingruppen von verschiedenen Zeitpunkten innerhalb eines Clusters

Die Annotationsgruppen *Ribosome/Translation* und *Embryonic/Post-embryonic development* haben wieder die höchste Signifikanz für die neu synthetisierten Proteine in den Proben beim Daueraustritt T=8 h und auch für die Proteine mit stets erhöhtem H/L-Verhältnis beim Daueraustritt von T=1 bis 8 h. Die angereicherte KEGG-Kategorie *Ribosome* enthält 80 Proteine für die neu synthetisierten Proteine in den Proben beim Daueraustritt T=8 h und 79 Proteine davon haben erhöhte H/L-Verhältnisse beim Daueraustritt von T=1 bis 8 h. Die Kategorie deckt sich auch mit allen 30 Proteinen mit stets erhöhter Proteinmenge aus dem label-freien Experiment (Exp. 23, Cluster 4+6).

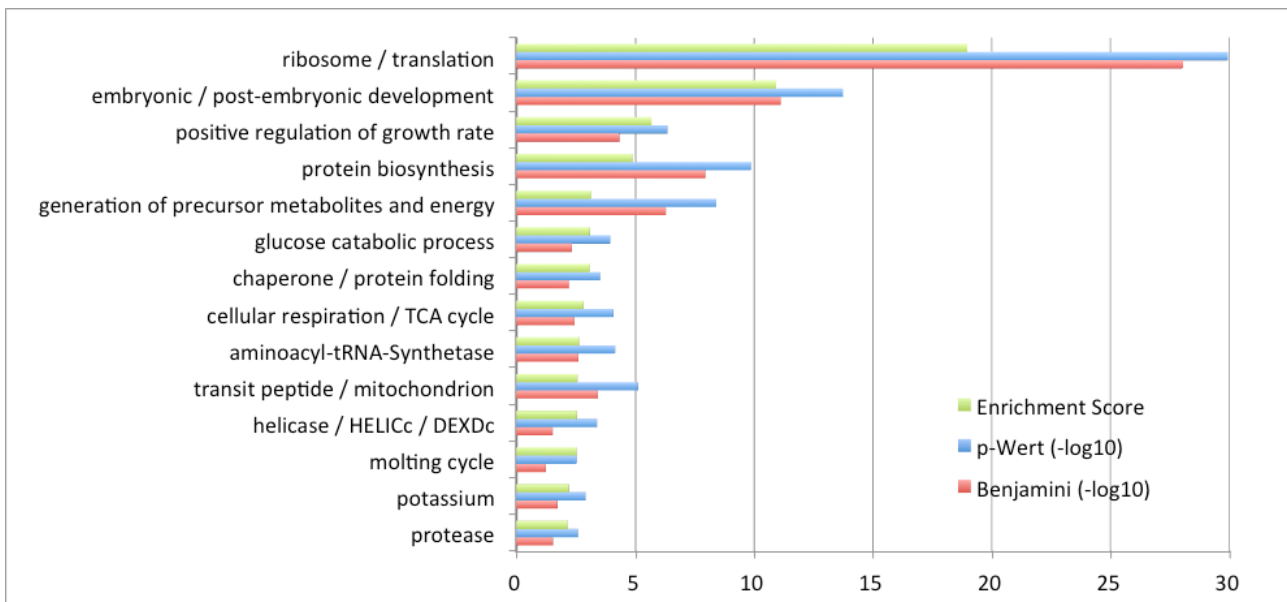


Abb. 3-29 Die Anreicherung für die Proteingruppen in Cluster 1, 3 und 5 nach der funktionellen Annotation durch DAVID

Als Top-Gruppen werden die Annotationsgruppen mit *Enrichment Score* größer als 2 und den Benjamini-Werten kleiner als 0,05 dargestellt.

Die Annotationsgruppe *Molting cycle* beinhaltet den größten Unterschied im Ranking in Abb. 3-27 und Abb. 3-29. In dieser Gruppe existieren 81 Proteine für die neu synthetisierten Proteine aus den Proben vom Daueraustritt T=8 h und 50 Proteine mit erhöhten H/L-Verhältnissen beim Daueraustritt von T=1 bis 8 h. 47 dieser 50 Proteine werden in diesen 81 neu synthetisierten Proteinen wieder gefunden. Es ist offensichtlich, dass mehr Proteine im Bezug auf *Molting cycle* vor der Häutung beim Daueraustritt T=8 h synthetisiert werden. Somit ist deren funktionelle Anreicherung signifikanter für die Proben beim Daueraustritt T=8 h. Beim label-freien Experiment wurden 21 Proteine, deren Proteinmengen stets steigen, identifiziert. Zwölf Proteine davon wurden als die Proteine mit erhöhten H/L-Verhältnissen beim Daueraustritt von T=1 h bis T=8 h identifiziert, z.B. IMB-3 (C53D5.6) und POD-2 (W09B6.1). IMB-3 wird als ein Kerntransport-Faktor (Importin β -3) vorhergesagt. Er interagiert wahrscheinlich mit GTPase RAN-1 zur Regulierung des Kernimport von ribosomalen Proteinen [Chou, et al., 2010; Fraser, et al., 2000; Maeda, et al., 2001; Nollen, et al., 2004]. POD-2 wird durch die Ähnlichkeit der Sequenzen als Acetyl-CoA-Carboxylase vorhergesagt und katalysiert vermutlich die ersten Schritte in der *de novo* Fettsäuresynthese. Es ist auch für die Häutung erforderlich [Frand, et al., 2005; Kamath, et al., 2003].

Protein biosynthesis wird für die beiden Analysen als die vierthöchste Signifikanz der Annotationsgruppen angereichert. Die Kategorie *Protein biosynthesis* enthält 33 Proteine mit erhöhtem H/L-Verhältnis beim Daueraustritt von T=1 bis 8 h. Alle 33 Proteine und weitere neun Proteine werden als neu synthetisierte Proteine in den Proben beim Daueraustritt T=8 h gefunden. In dieser Gruppe finden sich auch die assoziierten Kategorien, wie *Translation factor activity*, *Initiation factor* (z.B. EIF-3, IFE-2, IFE-3), *Elongation factor* (z.B. EFT-3/4, IFF-2) und *PINT* (ein Term der Proteindomäne aus der SMART-Datenbank, z.B. CIF-1, EGL-45). Diese Annotationsgruppe ist auch Teil der angereicherten Annotationsgruppe *Aminoacyl-tRNA synthetase/Ligase*. Wir haben die neue Synthese von 18 Aminoacyl-tRNA-Synthetasen für 16 verschiedene Aminosäuren detektiert und bei 14 Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sind die H/L-Verhältnisse beim Daueraustritt von T=1 bis 8 h erhöht.

Die Annotationsgruppe *Positive regulation of growth rate* ist die zweitgrößte Gruppe bei der funktionellen Anreicherung durch DAVID. Sie enthält die Proteine aus Kategorien wie *Larval development*, *Ribonucleoprotein complex*, *Reproductive development*, *Mitochondrion*, *Epithelial morphogenesis*, *Protein biosynthesis*, *Generation of precursor metabolites and energy* usw.

Die Annotationsgruppe *Generation of precursor metabolites and energy* vereint die Kategorien in Bezug auf Ribonukleotid-Metabolismus (vor allem *Purine ribonucleotide metabolic process*) und oxidative Phosphorylierung. Drei andere Annotationsgruppen in Zusammenhang mit Energieerzeugung *Cellular respiration/TCA cycle*, *Glucose catabolic process* und *Mitochondrion/Transit peptide* sind auch angereichert. Abb. 3-29 zeigt die Überlappung dieser Kategorien (Daten für die neu synthetisierten Proteine beim Daueraustritt T=8 h). 76 Proteine werden beim Daueraustritt T=8 h als neu synthetisierte Proteine in der Kategorie *Generation of precursor metabolites and energy* (GO:0006091) angereichert und 58 Proteine davon haben stets erhöhte H/L-Verhältnisse beim Daueraustritt von T=1 bis 8 h. Die Kategorie *Ribonucleotide metabolic process* (GO:0009259) enthält 47 Proteine als neu synthetisierte Proteine beim Daueraustritt T=8 h (44 aus der Kategorie *Purine ribonucleotide metabolic process* GO:0009150) und teilt mit der Kategorie *Generation of precursor metabolites and energy* 25 neu synthetisierte Proteine. Alle 25 Proteine gehören zu der Kategorie *Oxidative phosphorylation* (GO:0006119) und sind als F-Typ oder V-Typ ATPasen annotiert. 17 dieser ATPasen haben erhöhte H/L-Verhältnisse beim Daueraustritt. Acht ATPasen sind F-Typ-ATPasen, die bei Eukaryoten im Mitochondrium sind und durch den Betrieb des passiven Protonenflusses ATP produzieren, z.B. ATP-2 (C34E10.6) und ATP-3 (F27C1.7). Weitere neun

ATPasen sind V-Typ-ATPasen, die sich in der Membran der anderen Zellorganellen wie Endosomen, Lysosomen und sekretorischen Vesikeln befinden, im Lysosom z.B. VHA-1 (R10E11.8), VHA-15 (T14F9.1), VHA-16 (C30F8.2) und VHA-19 (Y55H10A.1).

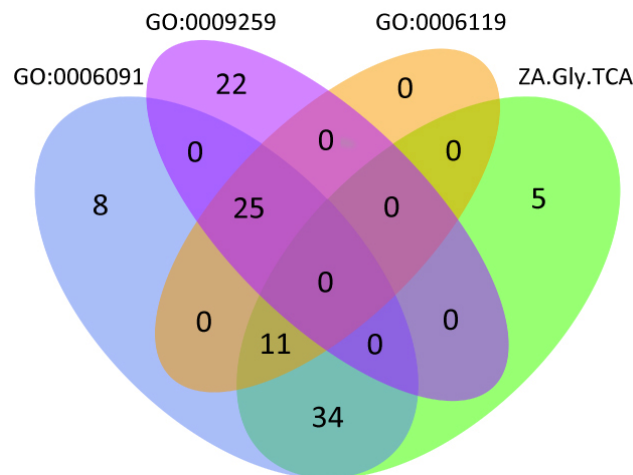


Abb. 3-29 Venn-Diagramm für die Proteine in den Kategorien im Zusammenhang mit dem Energiemetabolismus

GO:0006091, *Generation of precursor metabolites and energy*; GO:0009259, *Ribonucleotide metabolic process*; GO:0006119, *Oxidative phosphorylation*; ZA.Gly.TCA, die Zusammenfassung von *Cellular respiration* (GO:0045333), *Glucose catabolic process* (GO:0006007) und *TCA cycle* (GO:0006099).

In Abb. 3-29 stehen insgesamt 45 Proteine im Überlappungsbereich der Kategorien *Generation of precursor metabolites and energy* und *Cellular respiration* (GO:0045333)/*TCA cycle* (GO:0006099)/*Glucose catabolic process* (GO:0006007). Elf Proteine davon befinden sich auch in der Kategorie *Oxidative Phosphorylation* und sie alle gehören zu der Unterkategorie *Mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport* (GO:0042775). Die H/L-Verhältnisse von sieben dieser Proteine steigen beim Daueraustritt von T=1 bis 8 h, z.B. NADH-Dehydrogenase NUO-1 (C09H10.3) und NUO-5 (Y45G12B.1) sowie Cytochrom-C-Reduktase Eisen-Schwefel-Protein ISP-1 (F42G8.12). Die übrigen 34 Proteine enthalten die meisten Enzyme in den Pathways von Glykolyse, TCA Zyklus und Pyruvat-Metabolismus. Diese zusammengefasste Kategorie von drei GO-Termen umfasst die Energieerzeugung mit dem Abbau von Glucose. In dieser Kategorie sind die H/L-Verhältnisse der meisten neu synthetisierten Enzyme beim Daueraustritt erhöht (22/28 bei der Zellatmung, 14/17 beim TCA, 17/17 bei der Glykolyse und 17/22 beim Glucoseabbau). Die fünf nur in dieser Kategorie vorhandenen Proteine gehören zu der Kategorie *Pentose-phosphate shunt* (GO:0006098), der eine

Hauptquelle der Reduktionsäquivalente für die Biosynthese-Reaktionen und auch für die Umwandlung von Hexosen zu Pentosen wichtig ist. Die 22 nur in *Ribonucleotide metabolic process* vorhandenen Proteine kommen aus den GO-Termen *Purine ribonucleoside triphosphate biosynthetic process* (GO:0009206, neun Proteine, z.B. EAT-6 (B0365.3), Alpha-Untereinheit einer Natrium/Kalium-ATPase), *Purine ribonucleoside monophosphate biosynthetic process* (GO:0009168, acht Proteine, z.B. Guanin-Monophosphat-Synthase GMPS-1 (M106.4)) und *Pyrimidine ribonucleotide biosynthetic process* (GO:0009220, drei Proteine, z.B. Dihydropyrimidin-Dehydrogenase DPYD-1 (C25F6.3)). Die acht nur in *Generation of precursor metabolites and energy* vorhandenen Proteine bestehen aus sieben Enzymen aus der Elektronentransportkette (z.B. LET-721 (C05D11.12), CYC-2.1 (E04A4.7) und CYC2.2 (ZC116.2)) und eine Glykogen-Synthase GSY-1 (Y46G5A.31). Es ist unklar, warum diese sieben Proteine nicht in *Oxidative phosphorylation* stehen. Unsere Ergebnisse zeigen deutlich die Proteinneusynthese in den Kategorien der Energieerzeugung. Mitochondrien fungieren als Energiekraftwerke und dort sind viele Proteine im Zusammenhang mit dem Energiemetabolismus lokalisiert. In der Annotationsgruppe *Mitochondrion/Transit peptide* werden 95 Proteine als neu synthetisierte Proteine beim Daueraustritt T=8 h angereichert und die H/L- Verhältnisse von 57 Proteinen davon sind beim Daueraustritt erhöht.

Die Annotationsgruppe *Chaperone/Protein folding* enthält 33 Proteine (GO:0006457) für die neu synthetisierten Proteine beim Daueraustritt T=8 h und davon sind bei 24 Proteinen die H/L-Verhältnisse beim Daueraustritt erhöht, z.B. DAF-21 und HSP-6 (C37H5.8).

Die Kategorie *Peptidase* (GO:0070011) umfasst 49 Proteine für neu synthetisierte Proteine beim Daueraustritt T=8 h und bei 48 Proteinen davon sind die H/L-Verhältnisse beim Daueraustritt erhöht. Es gibt in der Kategorie 13 Cystein-Typ-Peptidasen (GO:0008234), z.B. USP-14 (C13B4.2). USP-14 ist homolog zur Ubiquitin-spezifischen Protease 14 und fungiert vermutlich im Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau oder reguliert die Lokalisierung des Proteins [Wilson, et al., 2002]. Zehn dieser 13 Enzyme sind im Lysosom lokalisiert, wie die Cathepsin-Z-like Peptidase CPZ-1 (F32B5.8) und Peptidasen der Cathepsin-L-Familie CPL-1 (T03E6.7). Außerdem stehen in dieser Kategorie auch elf Proteine aus dem GO-Term *Serine-type peptidase* (GO:0008236), z.B. Ubiquinol-Cytochrom-C-Oxidoreduktase-Komplex UCR-1 (F56D2.1) und sieben Aspartate-Typ-Peptidasen (GO:0070001), z.B. CASH-1 (K07C5.8). CASH-1 ist ortholog zu Drosophila CKA und humanen Striatinen und fungiert vermutlich als Proteingerüst zur Assoziierung der Signaltransduktionsproteine wie JKK-1 und JNK-1 mit Transkriptionsfaktoren wie JUN-1 oder FOS-1. Fünf

dieser Peptidasen gehören zu *Cell death* (GO:0008219), z.B. ASP-1 (Y39B6A.20), ASP-2 (T18H9.2), ASP-3 (H22K11.1), ASP-5 (F21F8.3) und ASP-6 (F21F8.7). Weitere sechs Threonin-Typ-Peptidasen (GO:0070003) sind dabei angereichert und alle sechs Proteine sind im *Proteasome complex* (GO:0000502) lokalisiert, z.B. vier alpha-Untereinheiten PAS-3 (Y110A7A.14), PAS-4 (C36B1.4), PAS-5 (F25H2.9), PAS-6 (CD4.6) und zwei beta-Untereinheiten PBS-3 (Y38A8.2), PBS-7 (F39H11.5).

Die Annotationsgruppen *Potassium* und *Helicase* sind für die Proteine mit erhöhten H/L-Verhältnissen beim Daueraustritt von T=1 bis 8 h angereichert. Die beiden sind auch für neu synthetisierten Proteine beim Daueraustritt T=8 h angereichert, aber erfüllen nicht die Voraussetzung zur Top-Gruppe (*Enrichment Score* ≥ 2 und Benjamini-Werte $\leq 0,05$).

In ungruppierten Kategorien (Anzahl der ähnlichen Kategorien in allen Datenbanken < 3) sind 43 Proteine unter dem Term *RNA binding* als neu synthetisierte Proteine beim Daueraustritt T=8 h angereichert. 30 dieser RNA-Bindungs-Proteine haben erhöhte H/L-Verhältnisse beim Daueraustritt von T=1 bis 8 h. Elf dieser 30 Proteine gehören zu *Ribosome* (GO:0005840) und vier Proteine fungieren als *Translation initiation factor activity* (GO:0003743), z.B. EIF-3.B (Y54E2A.11), EIF-3.G (F22B5.2), INF-1 (F57B9.6) und IFF-2 (F54C9.1). In dieser Kategorie gibt es vier Proteine aus dem Term *RNA splicing* (GO:0008380), z.B. Helikase HEL-1 (C26D10.2) und Spleißfaktor RSP-1 (W02B12.3), RSP-2 (W02B12.2) und RSP-3 (Y111B2A.18). Wir haben zusätzlich zwei Proteine (SNR-2 (W08E3.1) und HRP-1 (F42A6.7)) gefunden, die in der KEGG-Kategorie *Spliceosome* angereichert werden. SNR-2 ist eine Komponente des kleinen nukleären Ribonukleoprotein-Komplexes (snoRNP). Weitere vier Proteine stehen im Zusammenhang mit *rRNA processing* (GO:0006364), z.B. FIB-1 (T01C3.7), Y48A6B.3, Y66H1A.4, K01G5.5. Im Term *Helicase* (GO:0004386) sind sechs Enzyme wie HEL-1, INF-1 und die Keimbahn-Helikasen CGH-1 (C07H6.5), GLH-1 (T21G5.3), GLH-2 (C55B7.1) und GLH-3 (B0414.6) angereichert.

3.4 Etablierung eines neuen transkriptom-weiten Assays für die Charakterisierung post-transkriptioneller regulatorischer Elemente in *C. elegans*

Nach dem Umschreiben der genetischen Information von DNA in RNA werden Reifung, Lokalisierung, Stabilität der RNA-Transkripte und Neusynthese der Proteine durch die post-transkriptionelle Regulation gesteuert. Dabei spielen RNA-bindende Proteine (RBPs) eine wesentliche Rolle. RBPs binden an RNAs mittels sog. RNA-Erkennungsmotive, die bestimmte Sequenz- oder Sekundärstruktur-Motive, typischerweise in der 5' und 3'-UTR, binden. Vor kurzem wurde ein neuer Assay zur Bestimmung von RBP-Bindestellen auf mRNA (eng. *Protein Occupancy Profile on mRNA*, *popomR*) in HEK Zellen etabliert [Baltz, et al., 2012]. PopomR ist eine Variante von PAR-CLIP (engl. *Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation*, [Hafner, et al., 2010]). Bei der PAR-CLIP Methode wird mittels UV-Strahlung die Quervernetzung zwischen photoaktivierbaren Ribonukleotiden und RBPs etabliert und anschließend erfolgt eine Immunpräzipitation anhand des bekannten Targets im Proteinkomplex. Die RNA-Erkennungsmotive und die Komponenten vom Proteinkomplex werden jeweils durch RNA-seq und LC-MS/MS identifiziert. Bei der popomR Methode werden poly-A- RNAs nach der Quervernetzung präzipitiert und die RBP-gebundenen Sequenzen darauf werden nach RNA-Verdauung durch Sequenzierung bestimmt. Damit können alle vermeintlichen Proteinbindestellen auf poly-A-RNA durch ein Hochdurchsatz-Screening identifiziert werden. Wir etablierten als Erste diese Methode für *C. elegans* zur Charakterisierung post-transkriptioneller regulatorischer Elemente in kompletten vielzelligen Organismen.

3.4.1 *In vivo* Markierung der Würmer mit photoaktivierbaren Ribonukleotiden

Um RBPs an den Proteinbindestellen der RNA zu fixieren werden in RNAs von Würmer zuerst photoaktivierbare Ribonukleotide eingebaut. Wir gaben in die Flüssigkulturen von *C. elegans* Wildtyp und *umps-1* Mutante GH636 jeweils 2 mM 4-Thiouridine (4-sU) und/oder 6-Thioguanosine (6-sG) zu. 4-sU und 6-sG sind zwei alternative photoaktivierbare Ribonukleotide (Abb. 3-30H) und werden nach Phosphorylierung zu 4-thioUTP und 6-thioGTP in die RNA-Molekülen eingebaut. Nach der Präparation wurden jeweils 3 µg Gesamt-RNA von jeder Probe zum Dot-Blot herangezogen (Abb. 3-30). Die Intensität der Markierung der *umps-1* Mutante GH636 mit 2 mM 4-sU (Probe: F) ist viel stärker als alle anderen. *Umps-1* codiert für die Uridin-5'-Monophosphat-Synthase (UMPS-1). UMPS-1 katalysiert die Umwandlung von Orotsäure zu UMP, die vorletzte

und letzte Schritte der *de novo* Pyrimidin-Biosynthese [Levitte, et al., 2010]. Somit muss der Stamm GH636 exogenes Uridin verwenden und kann eine bessere Effizienz der Markierung von 4-sU erreichen. Nach unserer Beobachtung benötigte GH636 bis zum jungen Adult-Stadium ca. 10 Stunden länger als *C. elegans* Wildtyp N2. Die Zytotoxizität von 4-sU wurde bereits auf Zell-Ebene untersucht [Lozzio and Wigler, 1971; Melvin, et al., 1978]. Es gab bei unseren Experimenten für das Wachstum keinen signifikanten Unterschied zwischen den Flüssigkulturen mit 2 mM 4-sU und ohne 4-sU. Aufgrund der eingehenden Untersuchung wurde der GH636 Stamm mit einer 4-sU Konzentration von 2 mM für das popomR Experiment verwendet.

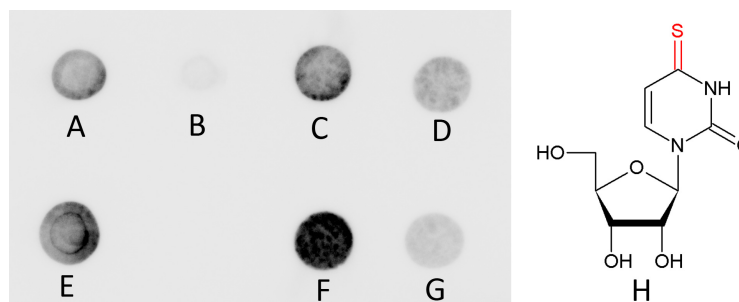


Abb. 3-30 Dot-Blot von 3 µg Gesamt-RNA für die *in vivo* Markierung

A-D: *C. elegans* Wildtyp N2 junge Adulte, A: 4sU+6sG je 2 mM, B: ohne 4sU oder 6sG, C: 2mM 4sU, D: 2mM 6sG, E: positive Kontrolle (HEK293 mit 0,2 mM 4sU) F-G: *umps-1* Mutante GH636 junge Adulte, F: 2 mM 4sU, G: 2mM 6sG, H: Strukturformel von 4-Thiouridine (4sU)

3.4.2 UV-Quervernetzung durch photoaktivierbare Ribonukleotide und poly-A-RNA-Präzipitation

4-sU wird bei der Transkription in die RNA eingebaut und ist empfänglich für die spezifische Photoaktivierung bei 320-370 nm [Favre, et al., 1986]. Im Vergleich zur herkömmlichen Quervernetzung durch UV-A Strahlung bei 254 nm erhöht sich die Effizienz der Quervernetzung durch photoaktivierbare Ribonukleotide 100- bis 1000-fach bei der gleichen Menge an Strahlungsenergie [Hafner, et al., 2010].

Nach der poly-A-RNA-Pulldown mit Oligo(dT) Beads wurden die Proben durch Rnase I verdaut und die von Proteinen geschützten Bindestellen von poly-A-RNAs waren übrig geblieben. Abb. 3-31 zeigt ein SDS-PAGE Proteingel nach Silberfärbung für Proben mit und ohne Quervernetzung durch 365 nm UV-Strahlung nach Rnase I Verdauung. Nach der UV-Quervernetzung wurden viel mehr

Proteine mit poly-A-RNA zusammen präzipitiert als die Referenzen ohne UV-Quervernetzung. Die Rnase I ist im Gel stark gefärbt.

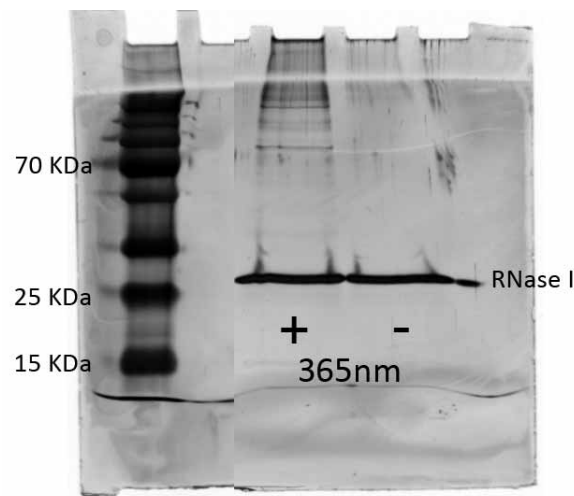


Abb. 3-31 SDS-PAGE und Silberfärbung für Würmer mit oder ohne Quervernetzung bei 365 nm UV-Strahlung

Die Eluate kamen aus jungen Adulten *umps-1* mutanten Würmern GH636. Die Würmer wurden in Flüssigkultur mit 2mM 4-sU aufgezüchtet.

3.4.3 Verteilung der charakterisierten Basenpaarsubstitutionen auf den poly-A-RNA-Molekülen

Eine Besonderheit des verwendeten Protokolls ist die Einführung der Basenpaarsubstitutionen während der Herstellung der cDNA-Bibliothek an 4-sU markierten Quervernetzungsstellen, die innerhalb oder neben Bindungsstellen von RBPs angereichert sind. Die UV-Quervernetzung führt zur Verbindung der Aminosäureseitenketten vom Protein mit 4-sU durch das Schwefelatom. Die „Thymin zu Cytosin“-Übergänge (TC-Übergänge) nehmen nach der Quervernetzung zu, da 4-sU eine Donorstelle verliert sowie eine zusätzliche Akzeptorstelle hinzugewinnt und infolgedessen Guanin statt Adenin in das cDNA-Template bei reverser Transkription übernommen wird [Hafner, et al., 2010]. Durch das Aufspüren dieser TC-Übergänge können Proteinbindestellen auf den poly-A-RNA-Molekülen mit höherer Auflösung identifiziert werden. Wir haben zwei biologische Replikate für junge Adulte und sechs Proben zu verschiedenen Zeitpunkten beim Daueraustritt präpariert und dann sequenziert (Tab. 3-1). Eine vergleichende Analyse der Profile aus verschiedenen Bedingungen ermöglicht es, die dynamische lokale Änderung der Proteinbindestellen auf den poly-A-RNA-Molekülen auszuwerten und die potenzielle biologische Bedeutung sowie deren Interpretation [Schueler, et al., 2014].

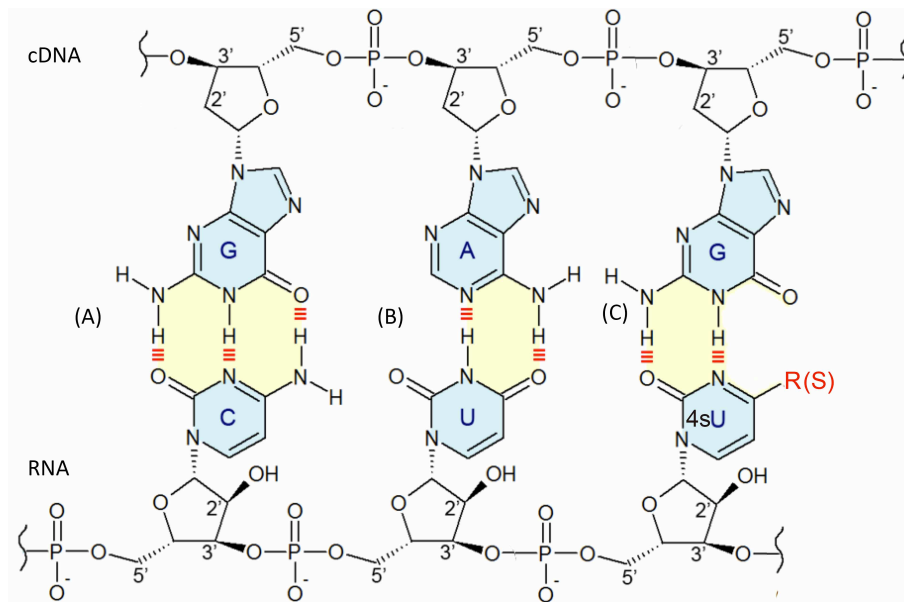


Abb. 3-32 Basenpaarsubstitution von Thymin zu Cytosin während der reversen Transkription

(A) und (B) normales C zu G und U zu A Umschreiben von RNA zu cDNA bei reverser Transkription (C) Verbindung der Aminosäure-Seitenkette durch das Schwefelatom mit 4-sU (S→R) nach der UV-Quervernetzung und 4-sU zu G Umschreiben durch zwei Akzeptorstellen von 4-sU. Die Abbildung stammt von wikipedia.org und wurde vom Author modifiziert.

Die Proteinbindestellen-Motive sind ca. 20-60 bp lang [Schueler, et al., 2014]. Deswegen existieren die Motive mit mehreren TC-Übergängen. Zur einfacheren Auswertung der Verteilungen der Reads und Basenpaarsubstitutionen haben wir in Abb. 3-33 nur die Reads mit genau einer Basenpaarsubstitution berücksichtigt. Die Verteilungen auf dem positiven und negativen Strang sind ähnlich. Angereicherte Positionen sind vor allem sense zum mRNA-Transkript zu finden, da dies der Leserichtung der mRNA entspricht. Die Anzahl der Reads ohne Basenpaarsubstitution sind häufiger als Reads mit einer Basenpaarsubstitution. In allen möglichen Basenpaarsubstitutionen charakterisieren wir die TC-Übergänge als dominant. Die Mapping-Positionen, die TC-Übergänge enthalten, stellen jeweils 42,61% und 49,28% aller Mapping-Positionen bei zwei biologischen Replikaten von jungen Adulten (Tab. 3-1) und durchschnittlich 32,26% für sechs Proben beim Daueraustritt dar. Damit wurden ca. 1,24 Mio. und 4,7 Mio. TC-Positionen, auf deren poly-A-RNA-Molekülen die TC-Übergänge vorkommen, in jungen Adulten identifiziert sowie 678.750 TC-Positionen beim Daueraustritt. 48,04% (ca. 0,6 Mio.) und 52,62% (ca. 2,5 Mio.) aller TC-Positionen in jungen Adulten haben mehr als einen gemappten Read mit TC-Übergang und 24,98% (ca. 0,18 Mio.) beim Daueraustritt.

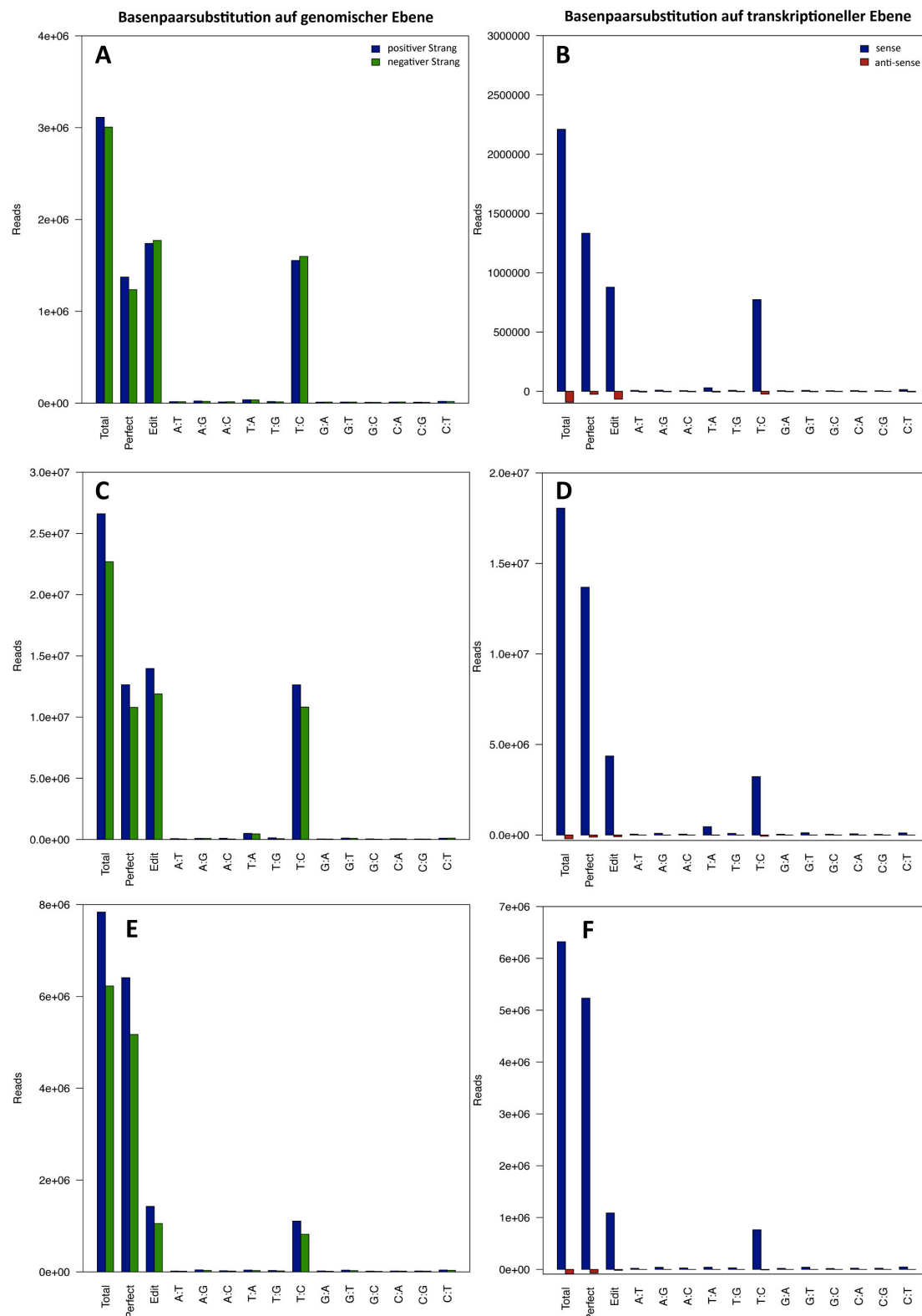


Abb. 3-33 Auswertung des Read-Mappings auf genomischer Ebene und auf transkriptioneller Ebene

A und B: junge Adulte von dem biologischen Replikant 1; C und D: junge Adulte von dem biologischen Replikant 2; E und F: Daueraustritt T=0 h. Die Abbildungen für andere Zeitpunkte sind im Anhang Abb. S-2 angegeben. Links (A, C, E): auf genomischer Ebene; Rechts (B, D, F): auf transkriptioneller Ebene. *Total*: die Gesamtanzahl der Reads; *Perfect*: Reads ohne Basenpaarsubstitution; *Edit*: Reads mit einer Basenpaarsubstitution.

Tab. 3-1 Die Sequenzierungsergebnisse für das popomR Experiment

| | Junge Adulte 1 | Junge Adulte 2 | Daueraustritt (durchschnittlich) |
|---|----------------|----------------|-------------------------------------|
| Gesamtanzahl der Reads | 11.412.073 | 112.023.891 | 17.579.540 |
| Gemappte Reads / Gesamtanzahl der Reads % | 74,68 % | 64,88 % | 48,05 % |
| Eindeutig gemappte Reads / Gemappte Reads % | 69,55 % | 73,89 % | 67,23 % |
| Gesamtanzahl der Mapping-Positionen | 11.392.877 | 100.004.338 | 12.722.392 |
| Anteil der Mapping-Positionen mit TC-Übergang % | 42,61 % | 49,28 % | 32,26 % |
| Gesamtanzahl der TC-Positionen | 1.239.373 | 4.705.139 | 678.750 |
| TC-Positionen der ≥ 2 gemappten Reads mit TC-Übergang / Gesamtanzahl der TC-Positionen % | 48,04 % | 52,62 % | 24,98 % |

Unsere Experimente von jungen Adulten zeigen reproduzierbare Ergebnisse. Die Verteilungen der Reads-Coverage (Zahl der Reads pro Position) und der TC-Positionen sind zwischen den biologischen Replikaten von jungen Adulten relativ gut korreliert (Abb. 3-34). Die Korrelationskoeffizienten sind jeweils 0,337 und 0,589, die damit deutlich höher als die Koeffizienten der zufälligen Verteilung (die rote Linie in Abb. 3-34) sind.

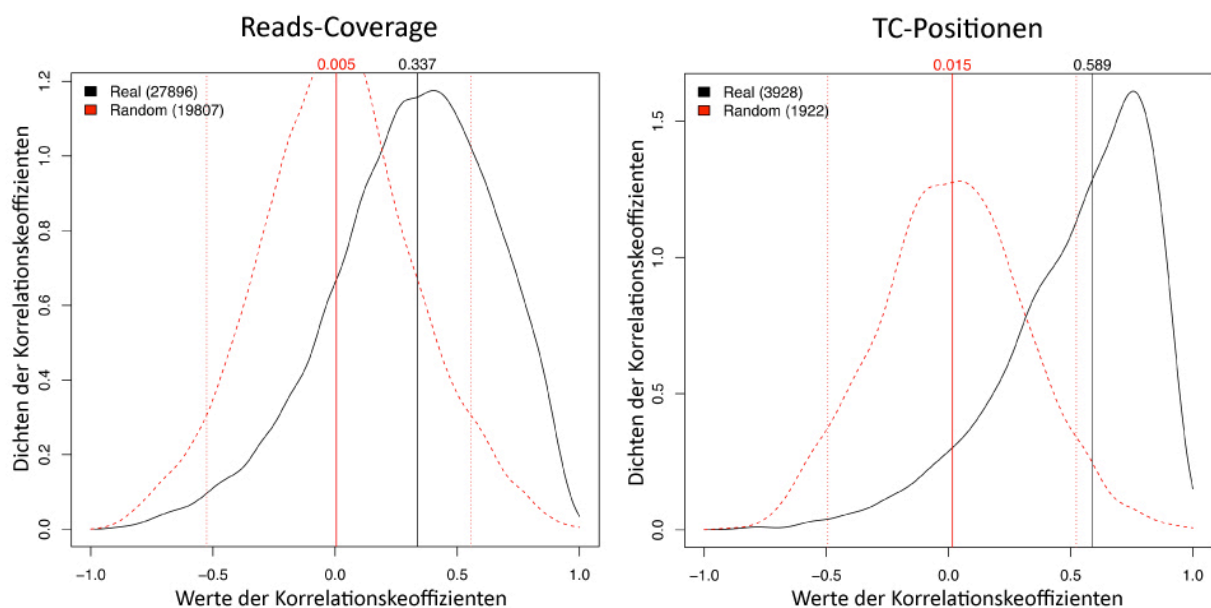


Abb. 3-34 Korrelation der Reads-Coverage und der TC-Positionen zwischen zwei biologischen Replikaten von jungen Adulten

Im Weiteren analysieren wir die Verteilung der TC-Positionen auf mRNA-Kompartimente und nach der Annotation der Transkripte. Die TC-Positionen bei den Proben von jungen Adulten verteilen sich regelmäßig auf 3'-UTR und kodierende RNA-Sequenzen (CDS). Über das ganze Transkript reichern sich die TC-Positionen eher im 3'-Bereich an. Auf der 5'-UTR wurden zu wenige TC-Positionen zur Analyse identifiziert. Die Proben beim Daueraustritt (Abb. 3-35-C und im Anhang Abb. S-3) zeigen im Gegensatz zu jungen Adulten keine signifikante Anreicherung von Proteinbindestellen in der 3'-UTR.

In den verschiedenen RNA-Typen wurden die TC-Positionen quasi ausschließlich auf Proteinkodierenden mRNA-Molekülen sowie deren Pseudogenen identifiziert. Nur wenige Reads liegen in rRNAs, snRNAs, snoRNAs (Abb. 3-35) und diese können als primäre Kontamination aus dem Pulldown Extrakt von Oligo(dT)-Beads angesehen werden. Die rRNAs kommen wahrscheinlich aus Ribosomen, die an poly-A-RNA gebunden sind. snRNAs (Abkürzung für kleine nukleäre Ribonukleinsäure, engl. *small nuclear ribonucleic acid*) sind im Zellkern lokalisiert und etwa 100 bis 300 Basenpaare lang. SnRNAs werden von der RNA-Polymerasen II und III transkribiert und bilden mit mehreren spezifischen Proteinen einen Komplex, die sog. snRNPs (*small nuclear Ribonucleoprotein Particles*). Das Spleißosom besteht aus fünf dieser snRNPs. Als Bestandteil des Spleißosoms ist snRNA für die Erkennung von Spleißstellen und das Spleißen der prä-mRNA erforderlich. Wenn das Spleißosom an Spleißstellen bindet, werden sie genau wie RBPs von Oligo(dT) Beads heruntergezogen und dann durch Proteine vom Spleißosom vor Verdauung geschützt. Die SnoRNA (Abkürzung für kleine nukleäre Ribonukleinsäure, engl. *small nuclear ribonucleic acid*) ist eine große Untergruppe der snRNAs, die an der Prozessierung und der chemischen Modifikation von tRNA, rRNA und anderen snRNA beteiligt ist. SnoRNAs lokalisieren RBPs an den richtigen Stellen auf der RNA. Dieser Kontakt zu RBPs erklärt ihre Detektierung in unserem Assay.

Polyadenylierung wird aktuell nicht nur bei mRNAs sondern auch bei ncRNAs [Anderson, 2005; Carninci, et al., 2005; Grzechnik and Kufel, 2008; Lemay, et al., 2010] gefunden. Deswegen könnte es sein, dass Vorläufer dieser ncRNAs bei Reifung oder ncRNAs zur Degradierung polyadenyliert werden und dadurch von Oligo(dT) Beads heruntergezogen werden.

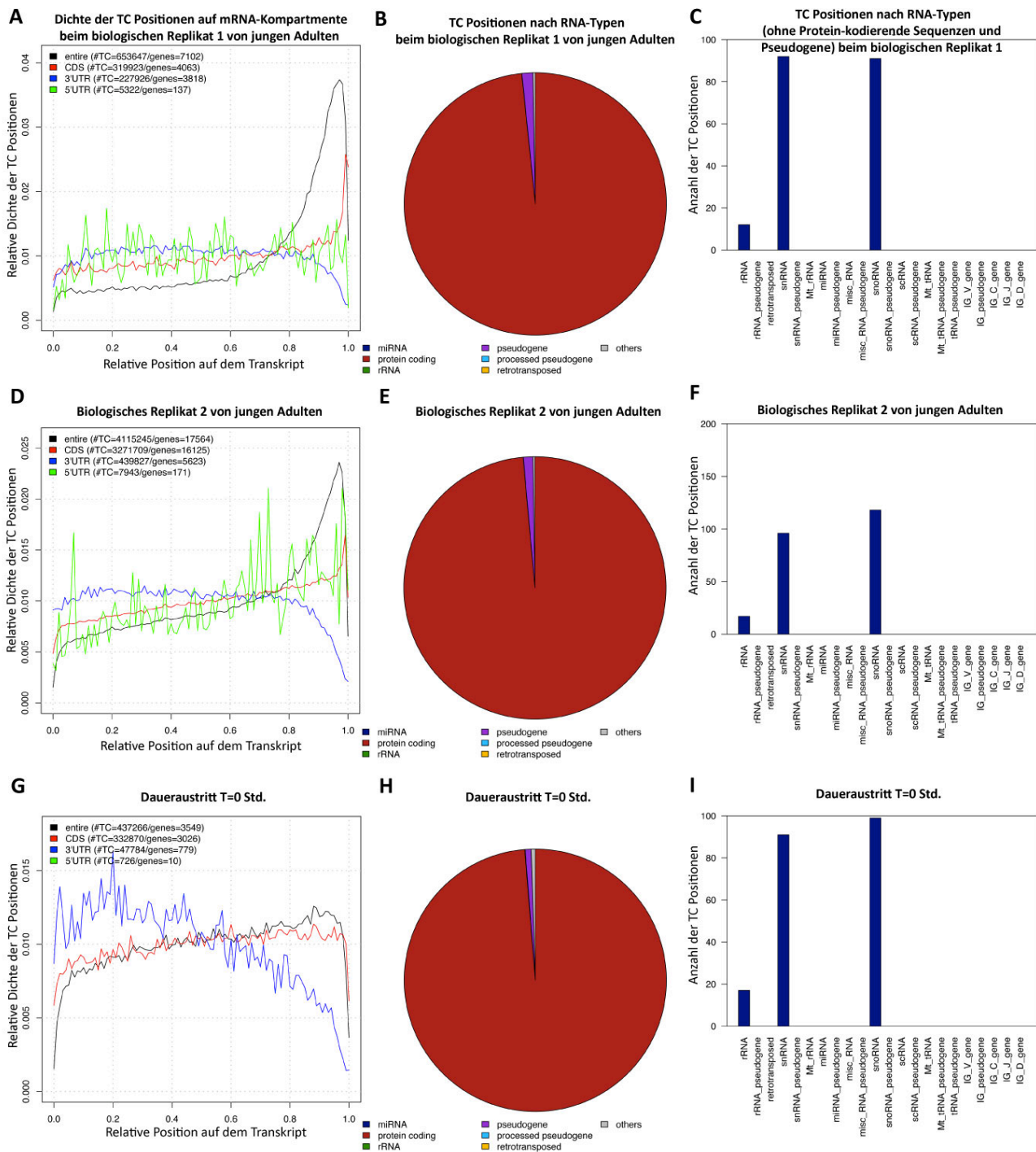


Abb. 3-35 Verteilungen der TC-Positionen auf mRNA-Kompartente und nach RNA-Typen

A-C: junge Adulte 1; D-F: junge Adulte 2; G-I: 0 Stunde Probe vom Daueraustritt. A, D und G: Verteilungen der TC-Positionen auf mRNA-Kompartente; B-C, E-F und H-I: Verteilungen der TC-Positionen nach RNA-Typen; Y-Achse auf C, F und I ist die Anzahl der TC-Positionen

3.4.4 *daf-21* als Beispiel für die popomR-Analyse

Neben den RBPs mit spezifischen RNA-Bindemotiven gibt es noch einige Proteingruppen, die an poly-A-RNAs binden können und mittels popomR identifiziert werden können [Baltz, et al., 2012]. Dazu gehören z.B. Translationsfaktoren, ribosomale Proteine, RNA-Helikasen, RNA-Modifikations-Enzyme, metabolische Enzyme, Nukleasen, Histone und Hitzeschock-Proteine. Durch die UV-Quervernetzung werden diese Proteine an den Bindestellen fixiert und vor Verdauung von RNase I die RNA-Motive geschützt. Unterschiedliche Affinitäten dieser Protein-mRNA Interaktionen und unterschiedliche Arten der Regulationsmechanismen können wahrscheinlich zu unterschiedlichen Pattern von TC-Positionen bei popomR führen. Manche Proteine, z.B. ribosomale Proteine und RNA-Helikasen, binden an zufälligen Stellen auf den poly-A-RNAs und ihre TC-Positionen können vielleicht deswegen nicht konserviert sein.

Abb. 3-36 zeigt das Gen *daf-21* als Beispiel für die Ergebnisse eines popomR-Assays und dessen Analyse. *daf-21* kodiert für ein molekulares Chaperon aus der HSP90 Familie in *C. elegans* (siehe Kapitel 3.1). Die Verteilung von popomR-Reads (gelb) ist stark korreliert mit der von den TC-Positionen (schwarz). Wir suchten beispielsweise manuell einige konservierte Positionen mit hohen TC-Übergängen aus, die in Abb. 3-36 mit den blauen Spalten markiert wurden. Diese Positionen auf der *daf-21* mRNA sind gute Kandidaten um ihren biologischen Funktionen zu untersuchen und zu interpretieren. Beispielsweise ist die Position mit einem roten Pfeil eine Spleißstelle für das Spleißosom. Wir haben auch einen konservierten Bereich (grün), wo es genüge Thymin aber keinen TC-Übergang gibt, gefunden. Solche Konservierungen können in Zukunft hoffentlich durch die Eigenschaften der 1D-Sequenz und 3D-Struktur von mRNA aufgeklärt werden. Beim Vergleich der Ergebnisse wird sofort deutlich, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Proben von jungen Adulten und Daueraustritt in der 3'-UTR besteht. Eine naheliegende Erklärung dafür ist eine im Vergleich zum Daueraustritt vermehrte Bindung von RBPs im jungen Adulten. Dieses könnte vielleicht darauf hindeuten, dass die posttranskriptionelle Regulation von *daf-21* über seine 3'-UTR bei jungen Adulten eine wichtigere Rolle spielt.

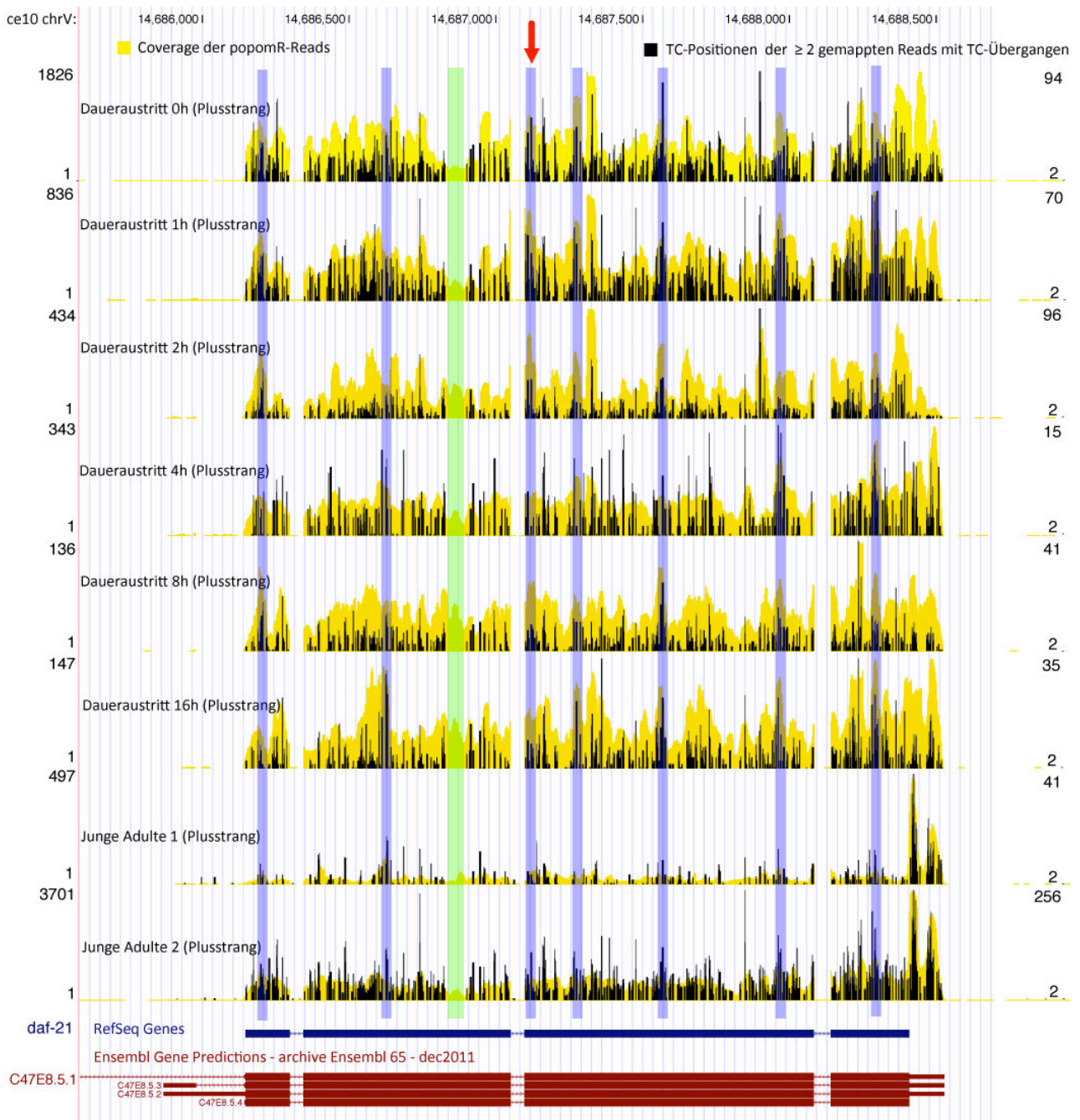


Abb. 3-36 Mapping der popomR-Reads und der TC-Übergänge auf dem Gen *daf-21* im UCSC Genome-Browser

Die Skala links repräsentiert die Anzahl der popomR-Reads und rechts für Reads mit TC-Übergängen, die maximalen Werte der Skalen entsprechen der Höhe des größten Peaks; blau: vermeintliche konservierte Proteinbindestellen mit TC-Positionen; grün: konservierte Stelle ohne TC-Position; roter Pfeil: Spleißstelle für das Spleißosom

4. Diskussion

4.1 Konservierte molekulare Signaturen der Regulation durch $\Delta 7$ -DA und Ascarosid bei Dauer- und infektiösen Larven

Durch die vergleichenden Analysen der Genexpressionsänderung auf RNA-Ebene und der Proteinsequenzvariation von Dauer- und infektiösen Larven zeigen unsere Ergebnisse, dass das Gen *daf-36* deutlich in vier Nematodenspezies konserviert ist. Aus früheren Forschungsergebnissen wissen wir, dass die DA Steroidhormone, insbesondere $\Delta 7$ -DA, in parasitären Nematoden die Bildung infektiöser Larven verhindert, wie auch die Dauerbildung in freilebenden Nematoden [Ogawa and Sommer, 2009; Ogawa, et al., 2009]. DAF-36 ist spezifisch für die Synthese von $\Delta 7$ -DA aber nicht für $\Delta 4$ -DA erforderlich [Dumas, et al., 2010] (Abb. 3-4). Unsere Ergebnisse erweitern das Wissen über die Konservierung entlang des Steroidhormon-Pathways.

Ascarosid-Signale induzieren die Bildung infektiöser Larven in parasitären Nematoden, während sie in freilebenden Nematoden als Daumone fungieren [Choe, et al., 2012]. In unserer Analyse sind zwei Gene, *daf-6* und *daf-10*, die zur Bildung der Zilien von chemosensorischen Neuronen erforderlich sind, und ein Gen vom Ascarosid-Rezeptor *daf-37* deutlich in Dauer- und infektiösen Larven bei ihren mRNA-Mengen und Proteinsequenzen konserviert. Ein anderes konserviertes Gen, *daf-11*, das für eine transmembrane Guanylylcyclase codiert, ist auch in Amphid-Neuronen exprimiert [Birnby, et al., 2000]. Das Enzym DAF-22, das die Biosynthese der Seitenketten von Ascarosid katalysiert [Pungalaya, et al., 2009], besitzt eine geringfügige Proteinsequenzvariation über den X-Achsen Vergleich. Unsere Ergebnisse deuten bei dem Ascarosid-Signaltransduktionsweg die Konservierung der Biosynthese von Liganden bis hin zu zellulären Rezeptionsstrukturen an.

Die Dauerbildung steht auch im Zusammenhang mit dem Insulin-like Pathway und dem TGF- β -like Pathway. Jedoch haben Studien von Orthologen im TGF β -Pathway in Nematoden keinen Beweis für die Konservierung bei Dauer- und infektiösen Larven gefunden [Brand, et al., 2005; Crook, et al., 2005; Freitas and Arasu, 2005; Gomez-Escobar, et al., 2000; Massey, et al., 2005; Viney, et al., 2005]. Unsere Ergebnisse zeigen auch keine signifikante Konservierung im TGF- β -like Pathway. Der Ligand des Insulin-like Pathway, DAF-28, und eine Komponente, DAF-18, sind konserviert in Proteinsequenz und Genexpression bei der Bildung der Dauerlarven und infektiösen Larven.

Unsere Studie bietet mittels der ähnlichen molekularen Signaturen zwischen Dauerlarven in freilebenden Nematoden und infektiösen Larven in parasitären Nematoden einen Beweis an, dass die Regulation für die Dauerbildung und für die Bildung infektiöser Larven beim endokrinen Mechanismus mit $\Delta 7$ -DA und Ascarosid-Signaltransduktionsweg konserviert ist. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese der ursprünglichen Dauerlarven als Präadaptation für den Übergang zur parasitären Lebensweise. Wir fanden auch, dass kein DAF-Protein schnell evolviert und sowohl bei Proteinsequenz als auch bei Genexpression weit divergiert.

Wir vermuten beispielsweise, dass die heutigen Dauerlarven die Situation der Genexpression und die Mechanismen der Genregulation für das Urogen von *daf-21* und *enpl-1* von den Dauerlarven der freilebenden Vorfahren erbten. Weiterhin nehmen wir an, dass infektiöse Larven zur Anpassung an die neue Umgebung in der Evolution auch die anderen Mechanismen der Genregulation des Urogens, außer den Mechanismen der Dauerlarven, beibehielten.

4.2 Molekulare Signatur des Dauer- und Postdauer-Stadiums

Durch die modernen Hochdurchsatz-Technologien RNA-seq und LC-MS/MS-basierte Shotgun Methoden haben wir erfolgreich die Proben von nicht-Dauer Mix, Dauerlarven, SDS-reinigten Dauerlarven und Larven des Daueraustritts für *C. elegans* und *C. briggsae* gemessen und mittels einer bioinformatischen Pipeline die Genexpression auf RNA-Ebene und Proteinebene quantifiziert. Diese Ergebnisse wurden dann durch funktionelle Anreicherung ausgewertet und verglichen. Unsere Analyse deutet an, dass *C. elegans* und *C. briggsae*, als zwei nah verwandte Arten, hohe Konservierung und geringe Divergenz bei der Genexpression in Dauer- und Postdauer-Stadium zeigen. Wir werden in Zukunft die Aussage mittels der vergleichenden Analyse des Zeitreihen-Experiments bei Dauerbildung und Daueraustritt von *C. elegans* und *C. briggsae* überprüfen. Die hoch konservierten molekularen Signaturen repräsentieren wahrscheinlich hoch konservierte Regulationsmechanismen für Dauer-bildung und Daueraustritt in *C. elegans* und *C. briggsae*.

Durch Vergleich des *C. elegans* Dauer mit nicht-Dauer Mix sowie des Daueraustritts T=8 h zu T=0 h haben wir die molekularen Signaturen von Dauer- und Postdauer-Stadium dargestellt. *C. elegans* Dauerlarven überleben lange unter harten Bedingungen durch Reduzierung der unwesentlichen biologischen Prozesse und des Energieumsatzes. Die mRNA-Mengen in Dauerlarven waren in 20 Stoffwechselwegen signifikant reduziert. Die Stoffwechselwege, deren mRNA-Mengen in Dauer-

larven anstiegen (z.B. *Ribosome*, *Purine metabolism*), zeigten in Postdauer signifikant erhöhte Proteinmengen (z.B. *Ribosome biogenesis in eukaryotes*, *Purine metabolism*, *Pyrimidine metabolism*). Diese mRNAs waren zur Vorbereitung des Daueraustritts in Dauerlarven reichlich gespeichert und gleichzeitig reduzierten sich ihre entsprechenden Proteinmengen in Dauerlarven, z.B. *Ribosome*, *Aminoacyl-tRNA biosynthesis*. Außerdem stiegen die Proteinmengen für *RNA polymerase*, *RNA transport*, *Protein export* und die mRNA-Mengen für *Protein export*, *Protein processing in ER* auch in Postdauer. Unsere Analyse deutet an, dass der Protein-Metabolismus in Dauerlarven der am stärksten unterdrückte Stoffwechselweg ist. Nicht nur für die Proteinsynthese sondern auch für die Protein-Verarbeitung (z.B. *Protein processing in ER*, *Proteasome*) waren die Proteinmengen signifikant in Dauerlarven reduziert. *Lysosome*, deren Proteinmenge in Dauerlarven steigt, lieferten wahrscheinlich mittels Autophagie die Substanzen für Stoffwechsel und Energieerzeugung in Dauerlarven. Zum Schluss haben wir die Biogenese von miRNAs, welche die RNA-Stabilität und translationale Effizienz steuern können, ausgewertet. Unsere Ergebnisse zeigten beim miRNA-Biogenese Pathway signifikant reduzierte RNA-Mengen in Dauerlarven und RNA- und Protein-Mengen stiegen beim Daueraustritt T=8 h.

4.3 Zeitreihenanalyse der Proteom-Remodellierung beim Daueraustritt

Durch die Zeitreihenanalyse der label-freien und pSILAC Experimente beim Daueraustritt haben wir die dynamische Remodellierung des Proteoms beim Daueraustritt ausgewertet. Unsere Ergebnisse zeigten den Anstieg der Gesamt-RNA und den Proteingewinn von *C. elegans* Proben beim Daueraustritt. Alle Proteine mit veränderter Häufigkeit wurden bezüglich ihrer Proteinmenge im label-freien Experiment und ihres H/L-Verhältnisses im pSILAC Experiment geclustert. Die funktionellen Merkmale jedes Clusters (z.B. GO, KEGG usw.) wurden weiter untersucht. Beim Daueraustritt wurde die Reduzierung der Proteinmenge von Dauer-assoziierten Proteinen (z.B. *Regulation of pharyngeal pumping* und *feeding behavior*, *Determination of adult life span*) identifiziert. Aufgrund der signifikanten Reduzierung der Proteinmengen der Kategorien: *Metal ion binding* und *Extracellular region/Signal* beim Daueraustritt vermuten wir, dass diese Proteine in *C. elegans* Dauerlarven eine wichtige Rolle spielen. Außerdem haben wir gefunden, dass der Protein-Abbau beim Daueraustritt mittels der Reduzierung der Proteinmenge von *Endopeptidase inhibitor activity* und der Erhöhung der Proteinmenge von *Protease/Aspartyl protease* hoch reguliert wurde. Während des Austritts von Dauerlarven nehmen Würmer wieder ihre Entwicklung zum L4-Stadium auf.

Deshalb wurde der Anstieg der Proteinmengen von *Molting cycle, collagen and cuticulin-based cuticle* und *Reproductive developmental process* beim Daueraustritt ebenfalls identifiziert. Durch pSILAC Experimente beim Daueraustritt haben wir die Ergebnisse von label-freien Experimenten bestätigt, z.B. die signifikante neue Synthetisierung der Proteine für Proteinbiosynthese, Protease und Häutungszyklen. Wir haben auch durch pSILAC Experimente detektiert, dass die Proteine für Energieerzeugung und Chaperone/Proteinfaltung beim Daueraustritt signifikant neu synthetisiert wurden. Im Gegensatz dazu wurden ihre Proteinmengen beim Daueraustritt durch die Auswertung der label-freien Experimenten nicht signifikant geändert. Diese Proteine wurden wahrscheinlich beim Daueraustritt verbraucht und schnell wieder hergestellt.

4.4 Detektierung der konservierten Proteinbindestellen durch den popomR-Assay

In unseren Wurmproben wurden photoaktivierbare Ribonukleotide (4-sU) erfolgreich in die RNAs eingebaut. Nach UV-Strahlung wurden die Quervernetzungen an den Proteinbindestellen mittels 4-sU stabilisiert. Die Proteine schützten während des Verdaus die Bindestellen von RNA und TC-Transitionen wurden in der reversen Transkription eingeführt. Wir zeigten die mutmaßlich konservierten Proteinbindestellen von *daf-21* als Beispiel für die Ergebnisse des popomR-Assays und dessen Analyse. Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen den Proben von jungen Adulten und Daueraustritt auf der 3'-UTR identifiziert.

Wir etablierten als Erste diese Methode für *C. elegans* zur Charakterisierung post-transkriptioneller regulatorischer Elemente in kompletten vielzelligen Organismen. Zum Screening der konservierten Proteinbindestellen wird ein Programm zur automatischen Auswertung der Verteilung und Konservierung der TC-Positionen im popomR-Assay implementiert.

Die im Experiment verwendete UV-Strahlung (365nm) gehört zum UV-A-Typ und die hohe Energie von UV-A kann im Menschen die Oberhaut durchdringen und bis zur Lederhaut gelangen. *C. elegans* ist ein vielzelliger Organismus mit vielen Zellschichten. Es ist noch nicht klar, ob die Vielschichtigkeit in *C.elegans* die Effizienz der UV-Quervernetzung und die Reproduzierbarkeit des popomR-Assays beeinträchtigt. Nur 4-sU wurde in unserem Experiment zur Stabilisierung der Quervernetzung verwendet. Die Proteinbindestellen ohne Uridin können nicht damit stabilisiert werden. Jedoch belegt Uridin in ca. 99,6% der 32-nt langen Sequenz bei HEK-Zellen, die der

Readlänge der Solexa-Sequenzierung entspricht [Baltz, et al., 2012]. Deswegen ist das Labelling von 4-sU ausreichend für unseren popomR-Assay.

4.5 Vergleichende Analyse der molekularen Signaturen des Dauer-Stadium in der evolutionären Entwicklungsbiologie

In unserer Studie suchen wir den Beweis, die Hypothese der ursprünglichen Dauerlarven als Präadaptation für den Übergang zur parasitären Lebensweise zu unterstützen. Wir fanden konservierte molekulare Signaturen der Regulation durch $\Delta 7$ -DA und Ascarosid bei Dauer- und infektiösen Larven. Zuerst wurde die hohe Konservierung durch unsere Analyse in Dauer- und Postdauer-Stadium zwischen zwei nah verwandten Arten *C. elegans* und *C. briggsae* identifiziert. Anschließend wurde die dynamische Remodellierung der molekularen Signaturen im Proteom bei Austritt aus dem Dauer-Stadium in *C. elegans* durch die Zeitreihenanalyse der label-freien und pSILAC Experimente dargestellt. Wegen der zeitlichen Beschränkung haben wir mit zwei Stämmen von *pash-1* Mutante und *xrn-2* Mutante, deren kodierten Enzyme an miRNA-Biogenese beteiligt sind, das Daueraustritts-Experiment durchgeführt, um unsere Aussage zu unterstützen. Die Datensätze werden gerade noch analysiert. Zum Schluss haben wir als Erste den popomR-Assay in *C. elegans* etabliert und ein Screening der vermeintlichen Proteinbindestellen auf poly-A-RNA durchgeführt, um in der Zukunft die konservierten Mechanismen der post-transkriptionellen Regulation durch RBPs im Dauer-Stadium zu analysieren.

Literaturverzeichnis

- Abad, P.; Gouzy, J.; Aury, J. M.; Castagnone-Sereno, P.; Danchin, E. G.; Deleury, E.;
Perfus-Barbeoch, L.; Anthouard, V.; Artiguenave, F.; Blok, V. C.; Caillaud, M. C.; Coutinho,
P. M.; Dasilva, C.; De Luca, F.; Deau, F.; Esquibet, M.; Flutre, T.; Goldstone, J. V.;
Hamamouch, N.; Hewezi, T.; Jaillon, O.; Jubin, C.; Leonetti, P.; Magliano, M.; Maier, T. R.;
Markov, G. V.; McVeigh, P.; Pesole, G.; Poulain, J.; Robinson-Rechavi, M.; Sallet, E.;
Segurens, B.; Steinbach, D.; Tytgat, T.; Ugarte, E.; van Ghelder, C.; Veronico, P.; Baum, T. J.;
Blaxter, M.; Bleve-Zacheo, T.; Davis, E. L.; Ewbank, J. J.; Favery, B.; Grenier, E.; Henrissat, B.;
Jones, J. T.; Laudet, V.; Maule, A. G.; Quesneville, H.; Rosso, M. N.; Schiex, T.; Smant, G.;
Weissenbach, J. and Wincker, P. (2008): Genome sequence of the metazoan plant-parasitic
nematode *Meloidogyne incognita*, Nat Biotechnol 26 [8], pp. 909-15
- Adamidi, C.; Wang, Y.; Gruen, D.; Mastrobuoni, G.; You, X.; Tolle, D.; Dodt, M.; Mackowiak, S. D.;
Gogol-Doering, A.; Oenal, P.; Rybak, A.; Ross, E.; Sanchez Alvarado, A.; Kempa, S.; Dieterich,
C.; Rajewsky, N. and Chen, W. (2011): De novo assembly and validation of planaria
transcriptome by massive parallel sequencing and shotgun proteomics, Genome Res 21 [7],
pp. 1193-200
- Albert, P. S.; Brown, S. J. and Riddle, D. L. (1981): Sensory control of dauer larva formation in
Caenorhabditis elegans, J Comp Neurol 198 [3], pp. 435-51
- Albert, P. S. and Riddle, D. L. (1983): Developmental alterations in sensory neuroanatomy of the
Caenorhabditis elegans dauer larva, J Comp Neurol 219 [4], pp. 461-81
- Albert, P. S. and Riddle, D. L. (1988): Mutants of *Caenorhabditis elegans* that form dauer-like larvae,
Dev Biol 126 [2], pp. 270-93
- Albertson, D. G. and Thomson, J. N. (1976): The pharynx of *Caenorhabditis elegans*, Philos Trans R
Soc Lond B Biol Sci 275 [938], pp. 299-325
- Albonico, M.; Crompton, D. W. and Savioli, L. (1999): Control strategies for human intestinal
nematode infections, Adv Parasitol 42, pp. 277-341
- Alexa, A.; Rahnenfuhrer, J. and Lengauer, T. (2006): Improved scoring of functional groups from
gene expression data by decorrelating GO graph structure, Bioinformatics 22 [13], pp.
1600-7
- Anderson, J. T. (2005): RNA turnover: unexpected consequences of being tailed, Curr Biol 15 [16],
pp. R635-8

- Ankeny, R. A. (2001): The natural history of *Caenorhabditis elegans* research, Nat Rev Genet 2 [6], pp. 474-9
- Arnold, D.; Wahl, C.; Faath, S.; Rammensee, H. G. and Schild, H. (1997): Influences of transporter associated with antigen processing (TAP) on the repertoire of peptides associated with the endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96, J Exp Med 186 [3], pp. 461-6
- Asencio, C.; Navas, P.; Cabello, J.; Schnabel, R.; Cypser, J. R.; Johnson, T. E. and Rodriguez-Aguilera, J. C. (2009): Coenzyme Q supports distinct developmental processes in *Caenorhabditis elegans*, Mech Ageing Dev 130 [3], pp. 145-53
- Asencio, C.; Rodriguez-Aguilera, J. C.; Ruiz-Ferrer, M.; Vela, J. and Navas, P. (2003): Silencing of ubiquinone biosynthesis genes extends life span in *Caenorhabditis elegans*, FASEB J 17 [9], pp. 1135-7
- Ashton, F. T.; Bhopale, V. M.; Fine, A. E. and Schad, G. A. (1995): Sensory neuroanatomy of a skin-penetrating nematode parasite: *Strongyloides stercoralis*. I. Amphidial neurons, J Comp Neurol 357 [2], pp. 281-95
- Ashton, F. T.; Bhopale, V. M.; Holt, D.; Smith, G. and Schad, G. A. (1998): Developmental switching in the parasitic nematode *Strongyloides stercoralis* is controlled by the ASF and ASI amphidial neurons, J Parasitol 84 [4], pp. 691-5
- Ashton, F. T. and Schad, G. A. (1996): Amphids in *Strongyloides stercoralis* and other parasitic nematodes, Parasitol Today 12 [5], pp. 187-94
- Baltz, A. G.; Munschauer, M.; Schwanhauser, B.; Vasile, A.; Murakawa, Y.; Schueler, M.; Youngs, N.; Penfold-Brown, D.; Drew, K.; Milek, M.; Wyler, E.; Bonneau, R.; Selbach, M.; Dieterich, C. and Landthaler, M. (2012): The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts, Mol Cell 46 [5], pp. 674-90
- Basu, S.; Binder, R. J.; Suto, R.; Anderson, K. M. and Srivastava, P. K. (2000): Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway, Int Immunol 12 [11], pp. 1539-46
- Batista, P. J.; Ruby, J. G.; Claycomb, J. M.; Chiang, R.; Fahlgren, N.; Kasschau, K. D.; Chaves, D. A.; Gu, W.; Vasale, J. J.; Duan, S.; Conte, D., Jr.; Luo, S.; Schroth, G. P.; Carrington, J. C.; Bartel, D. P. and Mello, C. C. (2008): PRG-1 and 21U-RNAs interact to form the piRNA complex required for fertility in *C. elegans*, Mol Cell 31 [1], pp. 67-78
- Bavay, A. (1876): Sur l'Anguillule stercorale. (Presentée par M.P. Gervias). C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. 83, pp. 694-696

- Bavay, A. (1877): Sur l'Anguillule intestinale (*Anguillula intestinalis*), nouveau ver nématode, trouvé par le Dr. Normand chez les malades atteints de diarrhée de Cochinchine. (Presentée par M.P. Gervias). C.R. Hebd. Séances Acad. Sci. 84, pp. 266-268
- Bell, L. R.; Stone, S.; Yochem, J.; Shaw, J. E. and Herman, R. K. (2006): The molecular identities of the *Caenorhabditis elegans* intraflagellar transport genes *dyf-6*, *daf-10* and *osm-1*, *Genetics* 173 [3], pp. 1275-86
- Binder, R. J.; Anderson, K. M.; Basu, S. and Srivastava, P. K. (2000): Cutting edge: heat shock protein gp96 induces maturation and migration of CD11c+ cells in vivo, *J Immunol* 165 [11], pp. 6029-35
- Birnby, D. A.; Link, E. M.; Vowels, J. J.; Tian, H.; Colacurcio, P. L. and Thomas, J. H. (2000): A transmembrane guanylyl cyclase (DAF-11) and Hsp90 (DAF-21) regulate a common set of chemosensory behaviors in *caenorhabditis elegans*, *Genetics* 155 [1], pp. 85-104
- Blaxter, M. (1998): *Caenorhabditis elegans* is a nematode, *Science* 282 [5396], pp. 2041-6
- Blaxter, M. (2011): Nematodes: the worm and its relatives, *PLoS Biol* 9 [4], p. e1001050
- Bongers, T. and Ferris, H. (1999): Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring, *Trends Ecol Evol* 14 [6], pp. 224-228
- Boxem, M. and van den Heuvel, S. (2002): *C. elegans* class B synthetic multivulva genes act in G(1) regulation, *Curr Biol* 12 [11], pp. 906-11
- Brand, A. M.; Varghese, G.; Majewski, W. and Hawdon, J. M. (2005): Identification of a DAF-7 ortholog from the hookworm *Ancylostoma caninum*, *Int J Parasitol* 35 [14], pp. 1489-98
- Bretscher, A. J.; Busch, K. E. and de Bono, M. (2008): A carbon dioxide avoidance behavior is integrated with responses to ambient oxygen and food in *Caenorhabditis elegans*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 [23], pp. 8044-9
- Butcher, R. A.; Ragains, J. R.; Li, W.; Ruvkun, G.; Clardy, J. and Mak, H. Y. (2009): Biosynthesis of the *Caenorhabditis elegans* dauer pheromone, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 [6], pp. 1875-9
- Byerly, L.; Cassada, R. C. and Russell, R. L. (1976): The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction, *Dev Biol* 51 [1], pp. 23-33
- Campbell, J.F. and Gaugler, R. (1993): Nictation behaviour and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditidae* and *Steinernematidae*). *Behaviour* 126, pp. 155-169
- Campbell, James F. and Kaya, Harry K. (1999): How and why a parasitic nematode jumps, *Nature* 397 [6719], pp. 485-486

- Carninci, P.; Kasukawa, T.; Katayama, S.; Gough, J.; Frith, M. C.; Maeda, N.; Oyama, R.; Ravasi, T.; Lenhard, B.; Wells, C.; Kodzius, R.; Shimokawa, K.; Bajic, V. B.; Brenner, S. E.; Batalov, S.; Forrest, A. R.; Zavolan, M.; Davis, M. J.; Wilming, L. G.; Aidinis, V.; Allen, J. E.; Ambesi-Impiombato, A.; Apweiler, R.; Aturaliya, R. N.; Bailey, T. L.; Bansal, M.; Baxter, L.; Beisel, K. W.; Bersano, T.; Bono, H.; Chalk, A. M.; Chiu, K. P.; Choudhary, V.; Christoffels, A.; Clutterbuck, D. R.; Crowe, M. L.; Dalla, E.; Dalrymple, B. P.; de Bono, B.; Della Gatta, G.; di Bernardo, D.; Down, T.; Engstrom, P.; Fagiolini, M.; Faulkner, G.; Fletcher, C. F.; Fukushima, T.; Furuno, M.; Futaki, S.; Gariboldi, M.; Georgii-Hemming, P.; Gingeras, T. R.; Gojobori, T.; Green, R. E.; Gustincich, S.; Harbers, M.; Hayashi, Y.; Hensch, T. K.; Hirokawa, N.; Hill, D.; Huminiecki, L.; Iacono, M.; Ikeo, K.; Iwama, A.; Ishikawa, T.; Jakt, M.; Kanapin, A.; Katoh, M.; Kawasawa, Y.; Kelso, J.; Kitamura, H.; Kitano, H.; Kollias, G.; Krishnan, S. P.; Kruger, A.; Kummerfeld, S. K.; Kurochkin, I. V.; Lareau, L. F.; Lazarevic, D.; Lipovich, L.; Liu, J.; Liuni, S.; McWilliam, S.; Madan Babu, M.; Madera, M.; Marchionni, L.; Matsuda, H.; Matsuzawa, S.; Miki, H.; Mignone, F.; Miyake, S.; Morris, K.; Mottagui-Tabar, S.; Mulder, N.; Nakano, N.; Nakauchi, H.; Ng, P.; Nilsson, R.; Nishiguchi, S.; Nishikawa, S.; Nori, F.; Ohara, O.; Okazaki, Y.; Orlando, V.; Pang, K. C.; Pavan, W. J.; Pavesi, G.; Pesole, G.; Petrovsky, N.; Piazza, S.; Reed, J.; Reid, J. F.; Ring, B. Z.; Ringwald, M.; Rost, B.; Ruan, Y.; Salzberg, S. L.; Sandelin, A.; Schneider, C.; Schonbach, C.; Sekiguchi, K.; Semple, C. A.; Seno, S.; Sessa, L.; Sheng, Y.; Shibata, Y.; Shimada, H.; Shimada, K.; Silva, D.; Sinclair, B.; Sperling, S.; Stupka, E.; Sugiura, K.; Sultana, R.; Takenaka, Y.; Taki, K.; Tammioja, K.; Tan, S. L.; Tang, S.; Taylor, M. S.; Tegner, J.; Teichmann, S. A.; Ueda, H. R.; van Nimwegen, E.; Verardo, R.; Wei, C. L.; Yagi, K.; Yamanishi, H.; Zabarovsky, E.; Zhu, S.; Zimmer, A.; Hide, W.; Bult, C.; Grimmond, S. M.; Teasdale, R. D.; Liu, E. T.; Brusic, V.; Quackenbush, J.; Wahlestedt, C.; Mattick, J. S.; Hume, D. A.; Kai, C.; Sasaki, D.; Tomaru, Y.; Fukuda, S.; Kanamori-Katayama, M.; Suzuki, M.; Aoki, J.; Arakawa, T.; Iida, J.; Imamura, K.; Itoh, M.; Kato, T.; Kawaji, H.; Kawagashira, N.; Kawashima, T.; Kojima, M.; Kondo, S.; Konno, H.; Nakano, K.; Ninomiya, N.; Nishio, T.; Okada, M.; Plessy, C.; Shibata, K.; Shiraki, T.; Suzuki, S.; Tagami, M.; Waki, K.; Watahiki, A.; Okamura-Oho, Y.; Suzuki, H.; Kawai, J.; Hayashizaki, Y.; Consortium, Fantom; Group, Riken Genome Exploration Research and Genome Science, Group (2005): The transcriptional landscape of the mammalian genome, *Science* 309 [5740], pp. 1559-63
- Cassada, R. C. and Russell, R. L. (1975): The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Dev Biol* 46 [2], pp. 326-42

- Ceol, C. J. and Horvitz, H. R. (2001): *dpl-1* DP and *efl-1* E2F act with *lin-35* Rb to antagonize Ras signaling in *C. elegans* vulval development, *Mol Cell* 7 [3], pp. 461-73
- Chen, N.; Harris, T. W.; Antoshechkin, I.; Bastiani, C.; Bieri, T.; Blasiar, D.; Bradnam, K.; Canaran, P.; Chan, J.; Chen, C. K.; Chen, W. J.; Cunningham, F.; Davis, P.; Kenny, E.; Kishore, R.; Lawson, D.; Lee, R.; Muller, H. M.; Nakamura, C.; Pai, S.; Ozersky, P.; Petcherski, A.; Rogers, A.; Sabo, A.; Schwarz, E. M.; Van Auken, K.; Wang, Q.; Durbin, R.; Spieth, J.; Sternberg, P. W. and Stein, L. D. (2005): WormBase: a comprehensive data resource for *Caenorhabditis* biology and genomics, *Nucleic Acids Res* 33 [Database issue], pp. D383-9
- Choe, A.; Chuman, T.; von Reuss, S. H.; Dossey, A. T.; Yim, J. J.; Ajredini, R.; Kolawa, A. A.; Kaplan, F.; Alborn, H. T.; Teal, P. E.; Schroeder, F. C.; Sternberg, P. W. and Edison, A. S. (2012): Sex-specific mating pheromones in the nematode *Panagrellus redivivus*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 [51], pp. 20949-54
- Chou, C. W.; Tai, L. R.; Kirby, R.; Lee, I. F. and Lin, A. (2010): Importin beta3 mediates the nuclear import of human ribosomal protein L7 through its interaction with the multifaceted basic clusters of L7, *FEBS Lett* 584 [19], pp. 4151-6
- Chow, D. K.; Glenn, C. F.; Johnston, J. L.; Goldberg, I. G. and Wolkow, C. A. (2006): Sarcopenia in the *Caenorhabditis elegans* pharynx correlates with muscle contraction rate over lifespan, *Exp Gerontol* 41 [3], pp. 252-60
- Corsi, A. K. (2006): A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans*, *Anal Biochem* 359 [1], pp. 1-17
- Cortez, D.; Glick, G. and Elledge, S. J. (2004): Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 [27], pp. 10078-83
- Cox, G. N.; Kusch, M.; DeNevi, K. and Edgar, R. S. (1981c): Temporal regulation of cuticle synthesis during development of *Caenorhabditis elegans*, *Dev Biol* 84 [2], pp. 277-85
- Cox, G. N.; Kusch, M. and Edgar, R. S. (1981a): Cuticle of *Caenorhabditis elegans*: its isolation and partial characterization, *J Cell Biol* 90 [1], pp. 7-17
- Cox, G. N.; Staprans, S. and Edgar, R. S. (1981b): The cuticle of *Caenorhabditis elegans*. II. Stage-specific changes in ultrastructure and protein composition during postembryonic development, *Dev Biol* 86 [2], pp. 456-70
- Cox, J. and Mann, M. (2008): MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification, *Nat Biotechnol* 26 [12], pp. 1367-72

- Crompton, D. W. T. (1987): Human helminthic populations. In Bailliere's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases, Z.S. Pawlowski, ed. (London: Academic Press), pp. 489–510.
- Crook, M.; Thompson, F. J.; Grant, W. N. and Viney, M. E. (2005): *daf-7* and the development of *Strongyloides ratti* and *Parastrongyloides trichosuri*, Mol Biochem Parasitol 139 [2], pp. 213-23
- Crossman, Deanna Carrick and Nicchitta, Christopher V (2007): Extracellular Functions for an Intracellular Protein: GRP94/GP96 Interactions with the Mammalian Immune System, Asea, Alexzander A. A. and Maio, Antonio De, Heat Shock Proteins: Potent Mediators of Inflammation and Immunity 1 pp. 147-158, Springer Netherlands
- Dalley, B. K.; Rogalski, T. M.; Tullis, G. E.; Riddle, D. L. and Golomb, M. (1993): Post-transcriptional regulation of RNA polymerase II levels in *Caenorhabditis elegans*, Genetics 133 [2], pp. 237-45
- Daniels, S. A.; Ailion, M.; Thomas, J. H. and Sengupta, P. (2000): *egl-4* acts through a transforming growth factor-beta/SMAD pathway in *Caenorhabditis elegans* to regulate multiple neuronal circuits in response to sensory cues, Genetics 156 [1], pp. 123-41
- Das, P. P.; Bagijn, M. P.; Goldstein, L. D.; Woolford, J. R.; Lehrbach, N. J.; Sapetschnig, A.; Buhecha, H. R.; Gilchrist, M. J.; Howe, K. L.; Stark, R.; Matthews, N.; Berezikov, E.; Ketting, R. F.; Tavare, S. and Miska, E. A. (2008): Piwi and piRNAs act upstream of an endogenous siRNA pathway to suppress Tc3 transposon mobility in the *Caenorhabditis elegans* germline, Mol Cell 31 [1], pp. 79-90
- Dierking, K.; Polanowska, J.; Omi, S.; Engelmann, I.; Gut, M.; Lembo, F.; Ewbank, J. J. and Pujol, N. (2011): Unusual regulation of a STAT protein by an SLC6 family transporter in *C. elegans* epidermal innate immunity, Cell Host Microbe 9 [5], pp. 425-35
- Dieterich, C.; Clifton, S. W.; Schuster, L. N.; Chinwalla, A.; Delehaunty, K.; Dinkelacker, I.; Fulton, L.; Fulton, R.; Godfrey, J.; Minx, P.; Mitreva, M.; Roeseler, W.; Tian, H.; Witte, H.; Yang, S. P.; Wilson, R. K. and Sommer, R. J. (2008): The *Pristionchus pacificus* genome provides a unique perspective on nematode lifestyle and parasitism, Nat Genet 40 [10], pp. 1193-8
- Dieterich, C. and Sommer, R. J. (2009): How to become a parasite - lessons from the genomes of nematodes, Trends Genet 25 [5], pp. 203-9
- Dodt, Matthias; Roehr, Johannes; Ahmed, Rina and Dieterich, Christoph (2012): FLEXBAR—Flexible Barcode and Adapter Processing for Next-Generation Sequencing

- Platforms, Biology 1 [3], pp. 895-905
- Duchaine, T. F.; Wohlschlegel, J. A.; Kennedy, S.; Bei, Y.; Conte, D., Jr.; Pang, K.; Brownell, D. R.; Harding, S.; Mitani, S.; Ruvkun, G.; Yates, J. R., 3rd and Mello, C. C. (2006): Functional proteomics reveals the biochemical niche of *C. elegans* DCR-1 in multiple small-RNA-mediated pathways, *Cell* 124 [2], pp. 343-54
- Dumas, K. J.; Guo, C.; Wang, X.; Burkhardt, K. B.; Adams, E. J.; Alam, H. and Hu, P. J. (2010): Functional divergence of dafachronic acid pathways in the control of *C. elegans* development and lifespan, *Dev Biol* 340 [2], pp. 605-12
- Eddy, S. R. (2009): A new generation of homology search tools based on probabilistic inference, *Genome Inform* 23 [1], pp. 205-11
- Edgar, R. C. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res* 32 [5], pp. 1792-7
- Estevez, M.; Attisano, L.; Wrana, J. L.; Albert, P. S.; Massague, J. and Riddle, D. L. (1993): The *daf-4* gene encodes a bone morphogenetic protein receptor controlling *C. elegans* dauer larva development, *Nature* 365 [6447], pp. 644-9
- Favre, A.; Moreno, G.; Blondel, M. O.; Kliber, J.; Vinzens, F. and Salet, C. (1986): 4-Thiouridine photosensitized RNA-protein crosslinking in mammalian cells, *Biochem Biophys Res Commun* 141 [2], pp. 847-54
- Finn, R. D.; Mistry, J.; Tate, J.; Coghill, P.; Heger, A.; Pollington, J. E.; Gavin, O. L.; Gunasekaran, P.; Ceric, G.; Forslund, K.; Holm, L.; Sonnhammer, E. L.; Eddy, S. R. and Bateman, A. (2010): The Pfam protein families database, *Nucleic Acids Res* 38 [Database issue], pp. D211-22
- Fisher, M. C. and Viney, M. E. (1998): The population genetic structure of the facultatively sexual parasitic nematode *Strongyloides ratti* in wild rats, *Proc Biol Sci* 265 [1397], pp. 703-9
- Frand, A. R.; Russel, S. and Ruvkun, G. (2005): Functional genomic analysis of *C. elegans* molting, *PLoS Biol* 3 [10], p. e312
- Franks, C. J.; Holden-Dye, L.; Bull, K.; Luedtke, S. and Walker, R. J. (2006): Anatomy, physiology and pharmacology of *Caenorhabditis elegans* pharynx: a model to define gene function in a simple neural system, *Invert Neurosci* 6 [3], pp. 105-22
- Fraser, A. G.; Kamath, R. S.; Zipperlen, P.; Martinez-Campos, M.; Sohrmann, M. and Ahringer, J. (2000): Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference, *Nature* 408 [6810], pp. 325-30
- Freitas, T. C. and Arasu, P. (2005): Cloning and characterisation of genes encoding two

- transforming growth factor-beta-like ligands from the hookworm, *Ancylostoma caninum*, *Int J Parasitol* 35 [14], pp. 1477-87
- Fürst von Lieven, Alexander (2005): The embryonic moult in diplogastrids (Nematoda) – homology of developmental stages and heterochrony as a prerequisite for morphological diversity, *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology* 244 [1], pp. 79-91
- Gaglia, M. M. and Kenyon, C. (2009): Stimulation of movement in a quiescent, hibernation-like form of *Caenorhabditis elegans* by dopamine signaling, *J Neurosci* 29 [22], pp. 7302-14
- Gardner, M. P.; Gems, D. and Viney, M. E. (2004): Aging in a very short-lived nematode, *Exp Gerontol* 39 [9], pp. 1267-76
- Gardner, M. P.; Gems, D. and Viney, M. E. (2006): Extraordinary plasticity in aging in *Strongyloides ratti* implies a gene-regulatory mechanism of lifespan evolution, *Aging Cell* 5 [4], pp. 315-23
- Georgi, L. L.; Albert, P. S. and Riddle, D. L. (1990): *daf-1*, a *C. elegans* gene controlling dauer larva development, encodes a novel receptor protein kinase, *Cell* 61 [4], pp. 635-45
- Gerisch, B.; Weitzel, C.; Kober-Eisermann, C.; Rottiers, V. and Antebi, A. (2001): A hormonal signaling pathway influencing *C. elegans* metabolism, reproductive development, and life span, *Dev Cell* 1 [6], pp. 841-51
- Gillan, V.; Maitland, K.; McCormack, G.; Him, N. A. and Devaney, E. (2009): Functional genomics of *hsp-90* in parasitic and free-living nematodes, *Int J Parasitol* 39 [10], pp. 1071-81
- Golden, J. W. and Riddle, D. L. (1984): The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone, food, and temperature, *Dev Biol* 102 [2], pp. 368-78
- Gomez-Escobar, N.; Gregory, W. F. and Maizels, R. M. (2000): Identification of *tgh-2*, a filarial nematode homolog of *Caenorhabditis elegans daf-7* and human transforming growth factor beta, expressed in microfilarial and adult stages of *Brugia malayi*, *Infect Immun* 68 [11], pp. 6402-10
- Grassi, G.B. (1879): *Sovra l'Anguillula intestinale*. *Rendiconti del Reale Istituto Lombardo di Scienze e Lettere*, Milano, second series 12, 228–233.
- Grzechnik, P. and Kufel, J. (2008): Polyadenylation linked to transcription termination directs the processing of snoRNA precursors in yeast, *Mol Cell* 32 [2], pp. 247-58
- Guengerich, F. P. (2007): Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview, *J Biochem Mol Toxicol* 21 [4], pp. 163-8
- Gunther, C. V.; Georgi, L. L. and Riddle, D. L. (2000): A *Caenorhabditis elegans* type I TGF beta receptor can function in the absence of type II kinase to promote larval development,

- Development 127 [15], pp. 3337-47
- Hafner, M.; Landthaler, M.; Burger, L.; Khorshid, M.; Hausser, J.; Berninger, P.; Rothballer, A.; Ascano, M., Jr.; Jungkamp, A. C.; Munschauer, M.; Ulrich, A.; Wardle, G. S.; Dewell, S.; Zavolan, M. and Tuschl, T. (2010): Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP, *Cell* 141 [1], pp. 129-41
- Hallem, E. A.; Dillman, A. R.; Hong, A. V.; Zhang, Y.; Yano, J. M.; DeMarco, S. F. and Sternberg, P. W. (2011): A sensory code for host seeking in parasitic nematodes, *Curr Biol* 21 [5], pp. 377-83
- Hallem, E. A. and Sternberg, P. W. (2008): Acute carbon dioxide avoidance in *Caenorhabditis elegans*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 [23], pp. 8038-43
- Harris, T. W.; Antoshechkin, I.; Bieri, T.; Blasiar, D.; Chan, J.; Chen, W. J.; De La Cruz, N.; Davis, P.; Duesbury, M.; Fang, R.; Fernandes, J.; Han, M.; Kishore, R.; Lee, R.; Muller, H. M.; Nakamura, C.; Ozersky, P.; Petcherski, A.; Rangarajan, A.; Rogers, A.; Schindelman, G.; Schwarz, E. M.; Tuli, M. A.; Van Auken, K.; Wang, D.; Wang, X.; Williams, G.; Yook, K.; Durbin, R.; Stein, L. D.; Spieth, J. and Sternberg, P. W. (2010): WormBase: a comprehensive resource for nematode research, *Nucleic Acids Res* 38 [Database issue], pp. D463-7
- Henderson, S. T. and Johnson, T. E. (2001): daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Curr Biol* 11 [24], pp. 1975-80
- Hodgkin, J. and Barnes, T. M. (1991): More is not better: brood size and population growth in a self-fertilizing nematode, *Proc Biol Sci* 246 [1315], pp. 19-24
- Holterman, M.; van der Wurff, A.; van den Elsen, S.; van Megen, H.; Bongers, T.; Holovachov, O.; Bakker, J. and Helder, J. (2006): Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown Clades, *Mol Biol Evol* 23 [9], pp. 1792-800
- Hong, R. L. and Sommer, R. J. (2006): *Pristionchus pacificus*: a well-rounded nematode, *Bioessays* 28 [6], pp. 651-9
- Hoogewijs, D.; Houthoofd, K.; Matthijssens, F.; Vandesompele, J. and Vanfleteren, J. R. (2008): Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in *C. elegans*, *BMC Mol Biol* 9, p. 9
- Hope, I. A.; Mounsey, A.; Bauer, P. and Aslam, S. (2003): The forkhead gene family of *Caenorhabditis elegans*, *Gene* 304, pp. 43-55

- Hotez, P.; Hawdon, J. and Schad, G. A. (1993): Hookworm larval infectivity, arrest and amphiparatensis: the *Caenorhabditis elegans* Daf-c paradigm, *Parasitol Today* 9 [1], pp. 23-6
- Huang da, W.; Sherman, B. T. and Lempicki, R. A. (2009): Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, *Nat Protoc* 4 [1], pp. 44-57
- Huber, W.; von Heydebreck, A.; Sultmann, H.; Poustka, A. and Vingron, M. (2002): Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression, *Bioinformatics* 18 Suppl 1, pp. S96-104
- Huey, Raymond B. and Pianka, Eric R. (1981): Ecological Consequences of Foraging Mode, *Ecology* 62 [4], pp. 991-999
- Inoue, T. and Thomas, J. H. (2000): Suppressors of transforming growth factor-beta pathway mutants in the *Caenorhabditis elegans* dauer formation pathway, *Genetics* 156 [3], pp. 1035-46
- Jean-Pierre, Hugot; Pierre, Baujard and Serge, Morand (2001): Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview 3 [3], pp. 199-208
- Jensen, V. L.; Bialas, N. J.; Bishop-Hurley, S. L.; Molday, L. L.; Kida, K.; Nguyen, P. A.; Blacque, O. E.; Molday, R. S.; Leroux, M. R. and Riddle, D. L. (2010): Localization of a guanylyl cyclase to chemosensory cilia requires the novel ciliary MYND domain protein DAF-25, *PLoS Genet* 6 [11], p. e1001199
- Jeong, M. H.; Kawasaki, I. and Shim, Y. H. (2010): A circulatory transcriptional regulation among *daf-9*, *daf-12*, and *daf-16* mediates larval development upon cholesterol starvation in *Caenorhabditis elegans*, *Dev Dyn* 239 [7], pp. 1931-40
- Jia, K.; Albert, P. S. and Riddle, D. L. (2002): DAF-9, a cytochrome P450 regulating *C. elegans* larval development and adult longevity, *Development* 129 [1], pp. 221-31
- Jia, K.; Chen, D. and Riddle, D. L. (2004): The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span, *Development* 131 [16], pp. 3897-906
- Jones, S. J.; Riddle, D. L.; Pouzyrev, A. T.; Velculescu, V. E.; Hillier, L.; Eddy, S. R.; Stricklin, S. L.; Baillie, D. L.; Waterston, R. and Marra, M. A. (2001): Changes in gene expression associated with developmental arrest and longevity in *Caenorhabditis elegans*, *Genome Res* 11 [8], pp. 1346-52
- Kamath, R. S.; Fraser, A. G.; Dong, Y.; Poulin, G.; Durbin, R.; Gotta, M.; Kanapin, A.; Le Bot, N.; Moreno, S.; Sohrmann, M.; Welchman, D. P.; Zipperlen, P. and Ahringer, J. (2003):

- Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi, *Nature* 421 [6920], pp. 231-7
- Kanehisa, M.; Goto, S.; Sato, Y.; Furumichi, M. and Tanabe, M. (2012): KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets, *Nucleic Acids Res* 40 [Database issue], pp. D109-14
- Kapulkin, W. J.; Hiester, B. G. and Link, C. D. (2005): Compensatory regulation among ER chaperones in *C. elegans*, *FEBS Lett* 579 [14], pp. 3063-8
- Karlin, S.; Brocchieri, L.; Bergman, A.; Mrazek, J. and Gentles, A. J. (2002): Amino acid runs in eukaryotic proteomes and disease associations, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [1], pp. 333-8
- Kayser, E. B.; Sedensky, M. M.; Morgan, P. G. and Hoppel, C. L. (2004): Mitochondrial oxidative phosphorylation is defective in the long-lived mutant *clk-1*, *J Biol Chem* 279 [52], pp. 54479-86
- Kimble, J. and Hirsh, D. (1979): The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*, *Dev Biol* 70 [2], pp. 396-417
- Kimura, E.; Shintoku, Y.; Kadosaka, T.; Fujiwara, M.; Kondo, S. and Itoh, M. (1999): A second peak of egg excretion in *Strongyloides ratti*-infected rats: its origin and biological meaning, *Parasitology* 119 (Pt 2), pp. 221-6
- Kimura, Y.; Corcoran, E. E.; Eto, K.; Gengyo-Ando, K.; Muramatsu, M. A.; Kobayashi, R.; Freedman, J. H.; Mitani, S.; Hagiwara, M.; Means, A. R. and Tokumitsu, H. (2002): A CaMK cascade activates CRE-mediated transcription in neurons of *Caenorhabditis elegans*, *EMBO Rep* 3 [10], pp. 962-6
- Korcekova, D.; Gombitova, A.; Raska, I.; Cmarko, D. and Lanctot, C. (2012): Nucleologenesis in the *Caenorhabditis elegans* embryo, *PLoS One* 7 [7], p. e40290
- Kosinski, RA and Zaremba, M (2007): Dynamics of the Model of the *Caenorhabditis elegans* Neural Network., *Acta Physica Polonica B* 38 (6): 2201
- Kubagawa, H. M.; Watts, J. L.; Corrigan, C.; Edmonds, J. W.; Sztul, E.; Browse, J. and Miller, M. A. (2006): Oocyte signals derived from polyunsaturated fatty acids control sperm recruitment in vivo, *Nat Cell Biol* 8 [10], pp. 1143-8
- Kunitomo, H.; Uesugi, H.; Kohara, Y. and Iino, Y. (2005): Identification of ciliated sensory neuron-expressed genes in *Caenorhabditis elegans* using targeted pull-down of poly(A) tails, *Genome Biol* 6 [2], p. R17
- Kuzuoglu-Ozturk, D.; Huntzinger, E.; Schmidt, S. and Izaurralde, E. (2012): The *Caenorhabditis*

- C. elegans* GW182 protein AIN-1 interacts with PAB-1 and subunits of the PAN2-PAN3 and CCR4-NOT deadenylase complexes, *Nucleic Acids Res* 40 [12], pp. 5651-65
- Lammert, E.; Arnold, D.; Nijenhuis, M.; Momburg, F.; Hammerling, G. J.; Brunner, J.; Stevanovic, S.; Rammensee, H. G. and Schild, H. (1997): The endoplasmic reticulum-resident stress protein gp96 binds peptides translocated by TAP, *Eur J Immunol* 27 [4], pp. 923-7
- Lant, B. and Storey, K. B. (2010): An overview of stress response and hypometabolic strategies in *Caenorhabditis elegans*: conserved and contrasting signals with the mammalian system, *Int J Biol Sci* 6 [1], pp. 9-50
- Lee, R. Y.; Hench, J. and Ruvkun, G. (2001): Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHRL1 by the daf-2 insulin-like signaling pathway, *Curr Biol* 11 [24], pp. 1950-7
- Lemay, J. F.; D'Amours, A.; Lemieux, C.; Lackner, D. H.; St-Sauveur, V. G.; Bahler, J. and Bachand, F. (2010): The nuclear poly(A)-binding protein interacts with the exosome to promote synthesis of noncoding small nucleolar RNAs, *Mol Cell* 37 [1], pp. 34-45
- Levitte, S.; Salesky, R.; King, B.; Coe Smith, S.; Depper, M.; Cole, M. and Hermann, G. J. (2010): A *Caenorhabditis elegans* model of orotic aciduria reveals enlarged lysosome-related organelles in embryos lacking *umps-1* function, *FEBS J* 277 [6], pp. 1420-39
- Li, L.; Stoeckert, C. J., Jr. and Roos, D. S. (2003): OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes, *Genome Res* 13 [9], pp. 2178-89
- Li, W.; Kennedy, S. G. and Ruvkun, G. (2003): daf-28 encodes a *C. elegans* insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway, *Genes Dev* 17 [7], pp. 844-58
- Lin, K.; Hsin, H.; Libina, N. and Kenyon, C. (2001): Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling, *Nat Genet* 28 [2], pp. 139-45
- Liu, H.; Sadygov, R. G. and Yates, J. R., 3rd (2004): A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics, *Anal Chem* 76 [14], pp. 4193-201
- Lorenzen, S. (2007): *Nemathelminthes i.e.S.*, Westheide, W. and Rieger, R., *Spezielle Zoologie* pp. 732-751, Spektrum Akademischer Verlag, München
- Lozzio, C. B. and Wigler, P. W. (1971): Cytotoxic effects of thiopyrimidines, *J Cell Physiol* 78 [1], pp. 25-32
- Luciani, G. M.; Magomedova, L.; Puckrin, R.; Urbanus, M. L.; Wallace, I. M.; Giaever, G.; Nislow, C.; Cummins, C. L. and Roy, P. J. (2011): Dafadine inhibits DAF-9 to promote dauer formation

- and longevity of *Caenorhabditis elegans*, *Nat Chem Biol* 7 [12], pp. 891-3
- Maeda, I.; Kohara, Y.; Yamamoto, M. and Sugimoto, A. (2001): Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi, *Curr Biol* 11 [3], pp. 171-6
- Massey, H. C.; Castelletto, M. L.; Bhopale, V. M.; Schad, G. A. and Lok, J. B. (2005): Sst-tgh-1 from *Strongyloides stercoralis* encodes a proposed ortholog of daf-7 in *Caenorhabditis elegans*, *Mol Biochem Parasitol* 142 [1], pp. 116-20
- Mayer, B. J. and Baltimore, D. (1993): Signalling through SH2 and SH3 domains, *Trends Cell Biol* 3 [1], pp. 8-13
- McCormick, M. A.; Tsai, S. Y. and Kennedy, B. K. (2011): TOR and ageing: a complex pathway for a complex process, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366 [1561], pp. 17-27
- Melendez, A.; Talloczy, Z.; Seaman, M.; Eskelinen, E. L.; Hall, D. H. and Levine, B. (2003): Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*, *Science* 301 [5638], pp. 1387-91
- Melvin, W. T.; Milne, H. B.; Slater, A. A.; Allen, H. J. and Keir, H. M. (1978): Incorporation of 6-thioguanosine and 4-thiouridine into RNA. Application to isolation of newly synthesised RNA by affinity chromatography, *Eur J Biochem* 92 [2], pp. 373-9
- Michaux, G.; Gansmuller, A.; Hindelang, C. and Labouesse, M. (2000): CHE-14, a protein with a sterol-sensing domain, is required for apical sorting in *C. elegans* ectodermal epithelial cells, *Curr Biol* 10 [18], pp. 1098-107
- Mitreva, M.; McCarter, J. P.; Martin, J.; Dante, M.; Wylie, T.; Chiapelli, B.; Pape, D.; Clifton, S. W.; Nutman, T. B. and Waterston, R. H. (2004): Comparative genomics of gene expression in the parasitic and free-living nematodes *Strongyloides stercoralis* and *Caenorhabditis elegans*, *Genome Res* 14 [2], pp. 209-20
- Miyadera, H.; Kano, K.; Miyoshi, H.; Ishii, N.; Hekimi, S. and Kita, K. (2002): Quinones in long-lived clk-1 mutants of *Caenorhabditis elegans*, *FEBS Lett* 512 [1-3], pp. 33-7
- Morley, J. F. and Morimoto, R. I. (2004): Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones, *Mol Biol Cell* 15 [2], pp. 657-64
- Motola, D. L.; Cummins, C. L.; Rottiers, V.; Sharma, K. K.; Li, T.; Li, Y.; Suino-Powell, K.; Xu, H. E.; Auchus, R. J.; Antebi, A. and Mangelsdorf, D. J. (2006): Identification of ligands for DAF-12 that govern dauer formation and reproduction in *C. elegans*, *Cell* 124 [6], pp. 1209-23
- Moussaif, M. and Sze, J. Y. (2009): Intraflagellar transport/Hedgehog-related signaling components couple sensory cilium morphology and serotonin biosynthesis in *Caenorhabditis elegans*, *J*

- Neurosci 29 [13], pp. 4065-75
- Murakami, M.; Koga, M. and Ohshima, Y. (2001): DAF-7/TGF-beta expression required for the normal larval development in *C. elegans* is controlled by a presumed guanylyl cyclase DAF-11, *Mech Dev* 109 [1], pp. 27-35
- Nelson, F. K.; Albert, P. S. and Riddle, D. L. (1983): Fine structure of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system, *J Ultrastruct Res* 82 [2], pp. 156-71
- Nollen, E. A.; Garcia, S. M.; van Haften, G.; Kim, S.; Chavez, A.; Morimoto, R. I. and Plasterk, R. H. (2004): Genome-wide RNA interference screen identifies previously undescribed regulators of polyglutamine aggregation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 [17], pp. 6403-8
- Nykamp, K.; Lee, M. H. and Kimble, J. (2008): *C. elegans* La-related protein, LARP-1, localizes to germline P bodies and attenuates Ras-MAPK signaling during oogenesis, *RNA* 14 [7], pp. 1378-89
- Ogawa, A. and Sommer, R. J. (2009): Developmental biology. Strategies to get arrested, *Science* 326 [5955], pp. 944-5
- Ogawa, A.; Streit, A.; Antebi, A. and Sommer, R. J. (2009): A conserved endocrine mechanism controls the formation of dauer and infective larvae in nematodes, *Curr Biol* 19 [1], pp. 67-71
- Ogg, S. and Ruvkun, G. (1998): The *C. elegans* PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway, *Mol Cell* 2 [6], pp. 887-93
- Ong, S. E.; Blagoev, B.; Kratchmarova, I.; Kristensen, D. B.; Steen, H.; Pandey, A. and Mann, M. (2002): Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics, *Mol Cell Proteomics* 1 [5], pp. 376-86
- Opperman, C. H.; Bird, D. M.; Williamson, V. M.; Rokhsar, D. S.; Burke, M.; Cohn, J.; Cromer, J.; Diener, S.; Gajan, J.; Graham, S.; Houfek, T. D.; Liu, Q.; Mitros, T.; Schaff, J.; Schaffer, R.; Scholl, E.; Sosinski, B. R.; Thomas, V. P. and Windham, E. (2008): Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: A compact nematode genome for plant parasitism, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 [39], pp. 14802-7
- Osche, G. (1956): Die Präadaptation freilebender Nematoden an den Parasitismus., *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology* 19, pp. 391-396
- Ostlund, G.; Schmitt, T.; Forslund, K.; Kostler, T.; Messina, D. N.; Roopra, S.; Frings, O. and Sonnhammer, E. L. (2010): InParanoid 7: new algorithms and tools for eukaryotic orthology analysis, *Nucleic Acids Res* 38 [Database issue], pp. D196-203

- Owen, D. J.; Ornaghi, P.; Yang, J. C.; Lowe, N.; Evans, P. R.; Ballario, P.; Neuhaus, D.; Filetici, P. and Travers, A. A. (2000): The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p, *EMBO J* 19 [22], pp. 6141-9
- Page, B. D.; Guedes, S.; Waring, D. and Priess, J. R. (2001): The *C. elegans* E2F- and DP-related proteins are required for embryonic asymmetry and negatively regulate Ras/MAPK signaling, *Mol Cell* 7 [3], pp. 451-60
- Paradis, S.; Ailion, M.; Toker, A.; Thomas, J. H. and Ruvkun, G. (1999): A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*, *Genes Dev* 13 [11], pp. 1438-52
- Park, D.; Estevez, A. and Riddle, D. L. (2010): Antagonistic Smad transcription factors control the dauer/non-dauer switch in *C. elegans*, *Development* 137 [3], pp. 477-85
- Park, D.; O'Doherty, I.; Somvanshi, R. K.; Bethke, A.; Schroeder, F. C.; Kumar, U. and Riddle, D. L. (2012): Interaction of structure-specific and promiscuous G-protein-coupled receptors mediates small-molecule signaling in *Caenorhabditis elegans*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 [25], pp. 9917-22
- Patel, D. S.; Fang, L. L.; Svy, D. K.; Ruvkun, G. and Li, W. (2008): Genetic identification of HSD-1, a conserved steroidogenic enzyme that directs larval development in *Caenorhabditis elegans*, *Development* 135 [13], pp. 2239-49
- Patkar, A. A.; Rozen, S.; Mannelli, P.; Matson, W.; Pae, C. U.; Krishnan, K. R. and Kaddurah-Daouk, R. (2009): Alterations in tryptophan and purine metabolism in cocaine addiction: a metabolomic study, *Psychopharmacology (Berl)* 206 [3], pp. 479-89
- Patterson, G. I.; Kowalik, A.; Wong, A.; Liu, Y. and Ruvkun, G. (1997): The DAF-3 Smad protein antagonizes TGF-beta-related receptor signaling in the *Caenorhabditis elegans* dauer pathway, *Genes Dev* 11 [20], pp. 2679-90
- Perens, E. A. and Shaham, S. (2005): *C. elegans* daf-6 encodes a patched-related protein required for lumen formation, *Dev Cell* 8 [6], pp. 893-906
- Perkins, L. A.; Hedgecock, E. M.; Thomson, J. N. and Culotti, J. G. (1986): Mutant sensory cilia in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Dev Biol* 117 [2], pp. 456-87
- Photos, A.; Gutierrez, A. and Sommer, R. J. (2006): sem-4/spalt and egl-17/FGF have a conserved role in sex myoblast specification and migration in *P. pacificus* and *C. elegans*, *Dev Biol* 293 [1], pp. 142-53
- Pires-daSilva, A. and Sommer, R. J. (2004): Conservation of the global sex determination gene tra-1

- in distantly related nematodes, *Genes Dev* 18 [10], pp. 1198-208
- Poulin, Robert (2007): *Evolutionary ecology of parasites*, 2nd. ed., Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Pungaliya, C.; Srinivasan, J.; Fox, B. W.; Malik, R. U.; Ludewig, A. H.; Sternberg, P. W. and Schroeder, F. C. (2009): A shortcut to identifying small molecule signals that regulate behavior and development in *Caenorhabditis elegans*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 [19], pp. 7708-13
- Qin, H.; Rosenbaum, J. L. and Barr, M. M. (2001): An autosomal recessive polycystic kidney disease gene homolog is involved in intraflagellar transport in *C. elegans* ciliated sensory neurons, *Curr Biol* 11 [6], pp. 457-61
- Ramirez, S. R.; Singh-Jasuja, H.; Warger, T.; Braedel-Ruoff, S.; Hilf, N.; Wiemann, K.; Rammensee, H. G. and Schild, H. (2005): Glycoprotein 96-activated dendritic cells induce a CD8-biased T cell response, *Cell Stress Chaperones* 10 [3], pp. 221-9
- Rappsilber, J.; Ishihama, Y. and Mann, M. (2003): Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics, *Anal Chem* 75 [3], pp. 663-70
- Rawlings, N. D.; Barrett, A. J. and Bateman, A. (2010): MEROPS: the peptidase database, *Nucleic Acids Res* 38 [Database issue], pp. D227-33
- Ren, P.; Lim, C. S.; Johnsen, R.; Albert, P. S.; Pilgrim, D. and Riddle, D. L. (1996): Control of *C. elegans* larval development by neuronal expression of a TGF-beta homolog, *Science* 274 [5291], pp. 1389-91
- Riddle, D. L. and Albert, P. S. (1997): *Genetic and Environmental Regulation of Dauer Larva Development*, Riddle, D. L.; Blumenthal, T.; Meyer, B. J. and Priess, J. R., *C. elegans* II, 2nd. ed., Cold Spring Harbor (NY)
- Riddle, D. L.; Swanson, M. M. and Albert, P. S. (1981): Interacting genes in nematode dauer larva formation, *Nature* 290 [5808], pp. 668-71
- Riddle, Donald L. (1988): The dauer larva. In *The nematode C. elegans* (ed. W.B. Wood). Chapter 12, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Rottiers, V.; Motola, D. L.; Gerisch, B.; Cummins, C. L.; Nishiwaki, K.; Mangelsdorf, D. J. and Antebi, A. (2006): Hormonal control of *C. elegans* dauer formation and life span by a Rieske-like oxygenase, *Dev Cell* 10 [4], pp. 473-82
- Ruaud, A. F. and Bessereau, J. L. (2006): Activation of nicotinic receptors uncouples a developmental

- timer from the molting timer in *C. elegans*, *Development* 133 [11], pp. 2211-22
- Rudel, D.; Riebesell, M. and Sommer, R. J. (2005): Gonadogenesis in *Pristionchus pacificus* and organ evolution: development, adult morphology and cell-cell interactions in the hermaphrodite gonad, *Dev Biol* 277 [1], pp. 200-21
- Sawin, E. R.; Ranganathan, R. and Horvitz, H. R. (2000): *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway, *Neuron* 26 [3], pp. 619-31
- Schad, G. A. (1989): Morphology and life history of *Strongyloides stercoralis*. In *Strongyloidiasis a major roundworm infection of man*, D.I. Grove, ed. (London: Taylor and Francis), pp. 85–104.
- Schueler, M.; Munschauer, M.; Gregersen, L. H.; Finzel, A.; Loewer, A.; Chen, W.; Landthaler, M. and Dieterich, C. (2014): Differential protein occupancy profiling of the mRNA transcriptome, *Genome Biol* 15 [1], p. R15
- Schwanhausser, B.; Gossen, M.; Dittmar, G. and Selbach, M. (2009): Global analysis of cellular protein translation by pulsed SILAC, *Proteomics* 9 [1], pp. 205-9
- Seidel, H. S. and Kimble, J. (2011): The oogenic germline starvation response in *C. elegans*, *PLoS One* 6 [12], p. e28074
- Silva, J. C.; Gorenstein, M. V.; Li, G. Z.; Vissers, J. P. and Geromanos, S. J. (2006): Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition, *Mol Cell Proteomics* 5 [1], pp. 144-56
- Singh-Jasuja, H.; Scherer, H. U.; Hilf, N.; Arnold-Schild, D.; Rammensee, H. G.; Toes, R. E. and Schild, H. (2000): The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor, *Eur J Immunol* 30 [8], pp. 2211-5
- Smant, G.; Stokkermans, J. P.; Yan, Y.; de Boer, J. M.; Baum, T. J.; Wang, X.; Hussey, R. S.; Gommers, F. J.; Henrissat, B.; Davis, E. L.; Helder, J.; Schots, A. and Bakker, J. (1998): Endogenous cellulases in animals: isolation of beta-1, 4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [9], pp. 4906-11
- Smyth, G. K. (2004): Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments, *Stat Appl Genet Mol Biol* 3, p. Article3
- Spanier, B.; Lasch, K.; Marsch, S.; Benner, J.; Liao, W.; Hu, H.; Kienberger, H.; Eisenreich, W. and Daniel, H. (2009): How the intestinal peptide transporter PEPT-1 contributes to an obesity phenotype in *Caenorhabditis elegans*, *PLoS One* 4 [7], p. e6279

- Spanier, B.; Rubio-Aliaga, I.; Hu, H. and Daniel, H. (2010): Altered signalling from germline to intestine pushes *daf-2;pept-1* *Caenorhabditis elegans* into extreme longevity, *Aging Cell* 9 [4], pp. 636-46
- Speare, R. (1989): Identification of species of *Strongyloides*. In *Strongyloidiasis a major roundworm infection of man*, D.I. Grove, ed. (London: Taylor and Francis), pp. 11–84.
- Srinivasan, J.; Sinz, W.; Lanz, C.; Brand, A.; Nandakumar, R.; Raddatz, G.; Witte, H.; Keller, H.; Kipping, I.; Pires-daSilva, A.; Jesse, T.; Millare, J.; de Both, M.; Schuster, S. C. and Sommer, R. J. (2002): A bacterial artificial chromosome-based genetic linkage map of the nematode *Pristionchus pacificus*, *Genetics* 162 [1], pp. 129-34
- Staniland, L. N. (1957): The swarming of Rhabditid eelworms in mushroom houses, *Plant Pathology* 6 [2], pp. 61-62
- Stein, L. D.; Bao, Z.; Blasiar, D.; Blumenthal, T.; Brent, M. R.; Chen, N.; Chinwalla, A.; Clarke, L.; Clee, C.; Coghlan, A.; Coulson, A.; D'Eustachio, P.; Fitch, D. H.; Fulton, L. A.; Fulton, R. E.; Griffiths-Jones, S.; Harris, T. W.; Hillier, L. W.; Kamath, R.; Kuwabara, P. E.; Mardis, E. R.; Marra, M. A.; Miner, T. L.; Minx, P.; Mullikin, J. C.; Plumb, R. W.; Rogers, J.; Schein, J. E.; Sohrmann, M.; Spieth, J.; Stajich, J. E.; Wei, C.; Willey, D.; Wilson, R. K.; Durbin, R. and Waterston, R. H. (2003): The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics, *PLoS Biol* 1 [2], p. E45
- Stiernagle, T. (2006): Maintenance of *C. elegans*, *WormBook*, pp. 1-11
- Stoltzfus, J. D.; Minot, S.; Berriman, M.; Nolan, T. J. and Lok, J. B. (2012): RNAseq analysis of the parasitic nematode *Strongyloides stercoralis* reveals divergent regulation of canonical dauer pathways, *PLoS Negl Trop Dis* 6 [10], p. e1854
- Suguna, K.; Padlan, E. A.; Smith, C. W.; Carlson, W. D. and Davies, D. R. (1987): Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: implications for a mechanism of action, *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 [20], pp. 7009-13
- Sulston, J. (1988): Cell lineage. In *The nematode C. elegans* (ed. W.B. Wood). Chapter 5, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sulston, J. E. and Horvitz, H. R. (1977): Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*, *Dev Biol* 56 [1], pp. 110-56
- Suo, S.; Kimura, Y. and Van Tol, H. H. (2006): Starvation induces cAMP response element-binding protein-dependent gene expression through octopamine-Gq signaling in *Caenorhabditis elegans*, *J Neurosci* 26 [40], pp. 10082-90

- Swanson, Margaret M. and Riddle, Donald L. (1981): Critical periods in the development of the *Caenorhabditis elegans* dauer larva, *Developmental Biology* 84 [1], pp. 27-40
- Swoboda, P.; Adler, H. T. and Thomas, J. H. (2000): The RFX-type transcription factor DAF-19 regulates sensory neuron cilium formation in *C. elegans*, *Mol Cell* 5 [3], pp. 411-21
- Takahashi, M.; Ogawara, M.; Shimizu, T. and Shirasawa, T. (2012): Restoration of the behavioral rates and lifespan in *clk-1* mutant nematodes in response to exogenous coenzyme Q(10), *Exp Gerontol* 47 [3], pp. 276-9
- Teichmann, S. A. and Chothia, C. (2000): Immunoglobulin superfamily proteins in *Caenorhabditis elegans*, *J Mol Biol* 296 [5], pp. 1367-83
- Thomas, J. H.; Birnby, D. A. and Vowels, J. J. (1993): Evidence for parallel processing of sensory information controlling dauer formation in *Caenorhabditis elegans*, *Genetics* 134 [4], pp. 1105-17
- Thompson, F. J.; Mitreva, M.; Barker, G. L.; Martin, J.; Waterston, R. H.; McCarter, J. P. and Viney, M. E. (2005): An expressed sequence tag analysis of the life-cycle of the parasitic nematode *Strongyloides ratti*, *Mol Biochem Parasitol* 142 [1], pp. 32-46
- Tischler, J.; Lehner, B.; Chen, N. and Fraser, A. G. (2006): Combinatorial RNA interference in *Caenorhabditis elegans* reveals that redundancy between gene duplicates can be maintained for more than 80 million years of evolution, *Genome Biol* 7 [8], p. R69
- Trapnell, C. and Salzberg, S. L. (2009): How to map billions of short reads onto genomes, *Nat Biotechnol* 27 [5], pp. 455-7
- Trapnell, C.; Williams, B. A.; Pertea, G.; Mortazavi, A.; Kwan, G.; van Baren, M. J.; Salzberg, S. L.; Wold, B. J. and Pachter, L. (2010): Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation, *Nat Biotechnol* 28 [5], pp. 511-5
- Umezawa, H.; Aoyagi, T.; Morishima, H.; Matsuzaki, M. and Hamada, M. (1970): Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes, *J Antibiot (Tokyo)* 23 [5], pp. 259-62
- van Megen, Hanny; van den Elsen, Sven; Holterman, Martijn; Karssen, Gerrit; Mooyman, Paul; Bongers, Tom; Holovachov, Oleksandr; Bakker, Jaap and Helder, Johannes (2009): A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences, *Nematology* 11 [6], pp. 927-950
- Viney, M. E.; Thompson, F. J. and Crook, M. (2005): TGF-beta and the evolution of nematode parasitism, *Int J Parasitol* 35 [14], pp. 1473-5

- Wadsworth, W. G. and Riddle, D. L. (1989): Developmental regulation of energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*, *Dev Biol* 132 [1], pp. 167-73
- Walker, G.; Houthoofd, K.; Vanfleteren, J. R. and Gems, D. (2005): Dietary restriction in *C. elegans*: from rate-of-living effects to nutrient sensing pathways, *Mech Ageing Dev* 126 [9], pp. 929-37
- Wang, G. and Reinke, V. (2008): A *C. elegans* Piwi, PRG-1, regulates 21U-RNAs during spermatogenesis, *Curr Biol* 18 [12], pp. 861-7
- Wang, J. and Kim, S. K. (2003): Global analysis of dauer gene expression in *Caenorhabditis elegans*, *Development* 130 [8], pp. 1621-34
- Wang, Y. and Levy, D. E. (2006): *C. elegans* STAT cooperates with DAF-7/TGF-beta signaling to repress dauer formation, *Curr Biol* 16 [1], pp. 89-94
- Ward, S. (1973): Chemotaxis by the nematode *Caenorhabditis elegans*: identification of attractants and analysis of the response by use of mutants, *Proc Natl Acad Sci U S A* 70 [3], pp. 817-21
- Watts, D. J. and Strogatz, S. H. (1998): Collective dynamics of 'small-world' networks, *Nature* 393 [6684], pp. 440-2
- White, J. G.; Southgate, E.; Thomson, J. N. and Brenner, S. (1986): The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 314 [1165], pp. 1-340
- Wilkes, C. P.; Thompson, F. J.; Gardner, M. P.; Paterson, S. and Viney, M. E. (2004): The effect of the host immune response on the parasitic nematode *Strongyloides ratti*, *Parasitology* 128 [Pt 6], pp. 661-9
- Wilson, S. M.; Bhattacharyya, B.; Rachel, R. A.; Coppola, V.; Tessarollo, L.; Householder, D. B.; Fletcher, C. F.; Miller, R. J.; Copeland, N. G. and Jenkins, N. A. (2002): Synaptic defects in ataxia mice result from a mutation in *Usp14*, encoding a ubiquitin-specific protease, *Nat Genet* 32 [3], pp. 420-5
- Winter, A. D.; Eschenlauer, S. C.; McCormack, G. and Page, A. P. (2007): Loss of secretory pathway FK506-binding proteins results in cold-sensitive lethality and associated extracellular matrix defects in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *J Biol Chem* 282 [17], pp. 12813-21
- Wood, W.B. (1988): *The Nematode Caenorhabditis elegans*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Xie, Y.; Moussaif, M.; Choi, S.; Xu, L. and Sze, J. Y. (2013): RFX transcription factor DAF-19 regulates 5-HT and innate immune responses to pathogenic bacteria in *Caenorhabditis*

- elegans*, PLoS Genet 9 [3], p. e1003324
- Yu, H. and Larsen, P. L. (2001): DAF-16-dependent and independent expression targets of DAF-2 insulin receptor-like pathway in *Caenorhabditis elegans* include FKBP, J Mol Biol 314 [5], pp. 1017-28
- Zanin, E.; Pacquelet, A.; Scheckel, C.; Ciosk, R. and Gotta, M. (2010): LARP-1 promotes oogenesis by repressing *fem-3* in the *C. elegans* germline, J Cell Sci 123 [Pt 16], pp. 2717-24
- Zeng, L. and Zhou, M. M. (2002): Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain, FEBS Lett 513 [1], pp. 124-8
- Zubenko, G. S.; Jones, M. L.; Estevez, A. O.; Hughes, H. B., 3rd and Estevez, M. (2009): Identification of a CREB-dependent serotonergic pathway and neuronal circuit regulating foraging behavior in *Caenorhabditis elegans*: a useful model for mental disorders and their treatments?, Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 150B [1], pp. 12-23

Anhang

Tab. S-1a Die Anreicherungsanalyse durch GO-Kategorien der molekularen Funktion für die Dauer-spezifische Proteine

| GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | p-value |
|------------|---|-----------|-------------|----------|----------|
| GO:0003700 | sequence-specific DNA binding transcript... | 24 | 22 | 7.1 | 2.70E-10 |
| GO:0008270 | zinc ion binding | 187 | 85 | 55.35 | 1.40E-06 |
| GO:0043565 | sequence-specific DNA binding | 21 | 16 | 6.22 | 1.30E-05 |
| GO:0004674 | protein serine/threonine kinase activity | 80 | 40 | 23.68 | 7.90E-05 |
| GO:0004713 | protein tyrosine kinase activity | 77 | 38 | 22.79 | 0.00017 |
| GO:0004497 | monooxygenase activity | 29 | 21 | 8.58 | 0.00018 |
| GO:0005249 | voltage-gated potassium channel activity | 9 | 8 | 2.66 | 0.00038 |
| GO:0020037 | heme binding | 32 | 19 | 9.47 | 0.00041 |
| GO:0004871 | signal transducer activity | 40 | 24 | 11.84 | 0.00055 |
| GO:0016455 | RNA polymerase II transcription mediator... | 6 | 6 | 1.78 | 0.00066 |
| GO:0030528 | transcription regulator activity | 35 | 25 | 10.36 | 0.00072 |
| GO:0004114 | 3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesteras... | 5 | 5 | 1.48 | 0.00225 |
| GO:0004500 | dopamine beta-monooxygenase activity | 7 | 6 | 2.07 | 0.00347 |
| GO:0005102 | receptor binding | 18 | 11 | 5.33 | 0.00528 |
| GO:0004725 | protein tyrosine phosphatase activity | 10 | 7 | 2.96 | 0.00966 |
| GO:0004568 | chitinase activity | 6 | 5 | 1.78 | 0.0102 |
| GO:0003712 | transcription cofactor activity | 8 | 6 | 2.37 | 0.01041 |
| GO:0016811 | hydrolase activity, acting on carbon-nit... | 13 | 8 | 3.85 | 0.01653 |
| GO:0004867 | serine-type endopeptidase inhibitor acti... | 18 | 10 | 5.33 | 0.01872 |
| GO:0003678 | DNA helicase activity | 7 | 5 | 2.07 | 0.027 |
| GO:0003725 | double-stranded RNA binding | 7 | 5 | 2.07 | 0.027 |
| GO:0003702 | RNA polymerase II transcription factor a... | 11 | 10 | 3.26 | 0.0286 |
| GO:0008080 | N-acetyltransferase activity | 14 | 8 | 4.14 | 0.02873 |
| GO:0003707 | steroid hormone receptor activity | 5 | 4 | 1.48 | 0.02917 |
| GO:0019825 | oxygen binding | 5 | 4 | 1.48 | 0.02917 |
| GO:0004721 | phosphoprotein phosphatase activity | 22 | 14 | 6.51 | 0.03466 |
| GO:0016773 | phosphotransferase activity, alcohol gro... | 122 | 59 | 36.11 | 0.03501 |

Tab. S-1b Die Anreicherungsanalyse durch GO-Kategorien der molekularen Funktion für die Daueraustritts-spezifische Proteine

| GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | p-value |
|------------|---|-----------|-------------|----------|---------|
| GO:0004806 | triglyceride lipase activity | 6 | 3 | 0.13 | 0.00018 |
| GO:0042302 | structural constituent of cuticle | 24 | 4 | 0.52 | 0.00152 |
| GO:0004768 | stearoyl-CoA 9-desaturase activity | 5 | 2 | 0.11 | 0.00442 |
| GO:0016740 | transferase activity | 366 | 15 | 7.92 | 0.02703 |
| GO:0016765 | transferase activity, transferring alkyl... | 14 | 2 | 0.3 | 0.03548 |

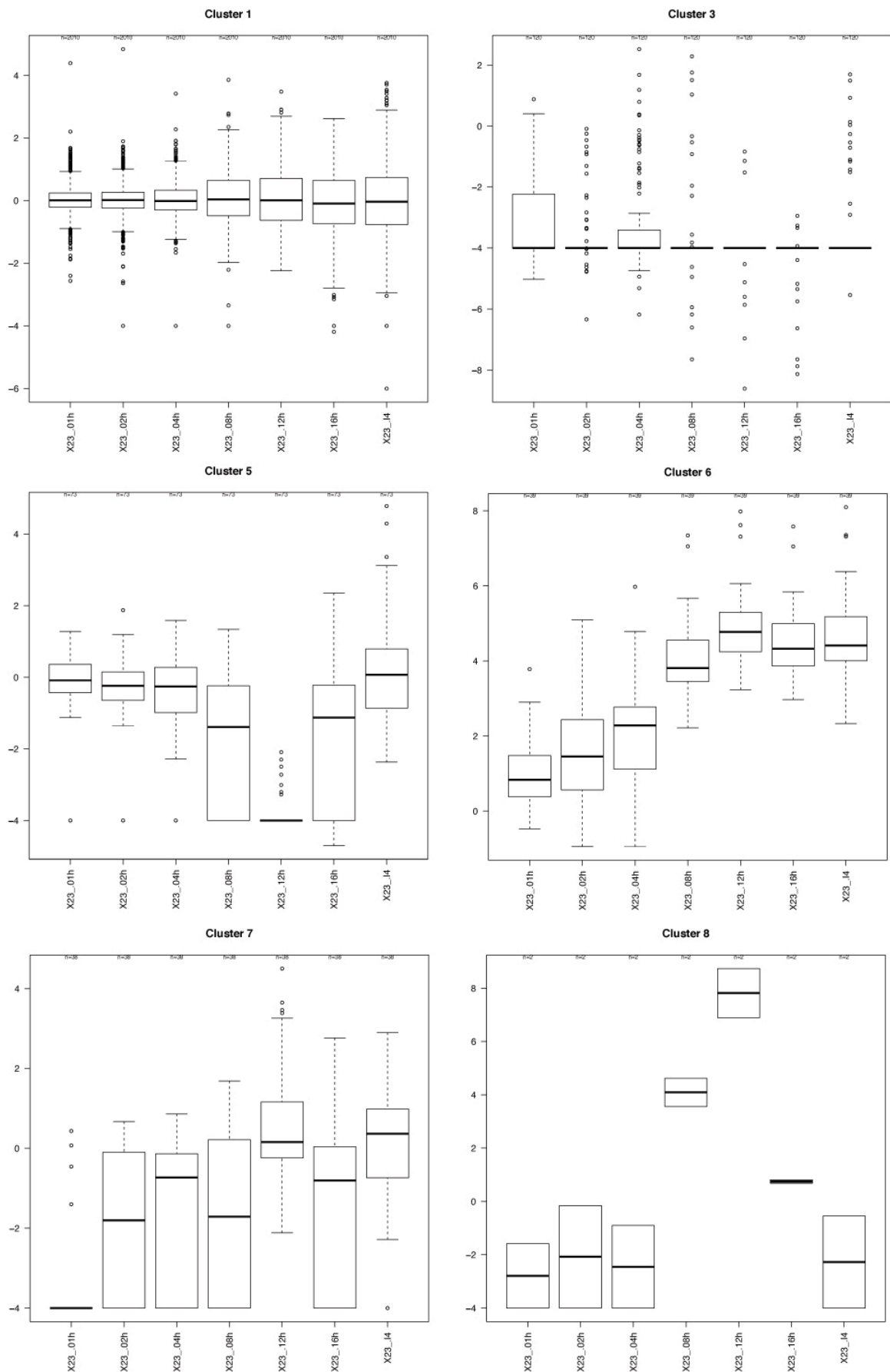
Tab. S-2 Die funktionelle Anreicherungsanalyse durch GO-Kategorien des biologischen Prozesses auf mRNA-Ebene in *C. elegans*

| mRNA Dauer Up | | | | | |
|---------------|---|-----------|-------------|----------|----------|
| GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | p-value |
| GO:0006412 | translation | 234 | 106 | 45.9 | 6.10E-17 |
| GO:0015671 | oxygen transport | 30 | 24 | 5.88 | 1.60E-12 |
| GO:0006813 | potassium ion transport | 109 | 52 | 21.38 | 2.70E-11 |
| GO:0006811 | ion transport | 437 | 170 | 85.72 | 1.30E-10 |
| GO:0006355 | regulation of transcription, DNA-depende... | 579 | 175 | 113.57 | 1.70E-10 |
| GO:0009190 | cyclic nucleotide biosynthetic process | 41 | 29 | 8.04 | 1.90E-09 |
| GO:0055085 | transmembrane transport | 447 | 137 | 87.68 | 7.40E-09 |
| GO:0006972 | hyperosmotic response | 14 | 11 | 2.75 | 3.30E-06 |
| GO:0042073 | intraflagellar transport | 10 | 9 | 1.96 | 3.50E-06 |
| GO:0035058 | sensory cilium assembly | 12 | 10 | 2.35 | 3.70E-06 |
| GO:0007218 | neuropeptide signaling pathway | 21 | 13 | 4.12 | 2.50E-05 |
| GO:0009408 | response to heat | 52 | 23 | 10.2 | 4.50E-05 |
| GO:0043053 | dauer entry | 29 | 15 | 5.69 | 0.00011 |
| GO:0043051 | regulation of pharyngeal pumping | 33 | 16 | 6.47 | 0.00017 |
| GO:0006414 | translational elongation | 16 | 10 | 3.14 | 0.00021 |
| GO:0006182 | cGMP biosynthetic process | 9 | 7 | 1.77 | 0.00027 |
| GO:0008355 | olfactory learning | 12 | 8 | 2.35 | 5.00E-04 |

| mRNA Dauer Down | | | | | |
|-----------------|---|-----------|-------------|----------|----------|
| GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | p-value |
| GO:0010171 | body morphogenesis | 697 | 390 | 273.52 | 1.10E-20 |
| GO:0000910 | cytokinesis | 147 | 111 | 57.69 | 1.10E-16 |
| GO:0002009 | morphogenesis of an epithelium | 412 | 237 | 161.68 | 2.80E-13 |
| GO:0045132 | meiotic chromosome segregation | 141 | 99 | 55.33 | 1.00E-12 |
| GO:0040035 | hermaphrodite genitalia development | 872 | 434 | 342.19 | 2.00E-11 |
| GO:0040011 | locomotion | 1692 | 772 | 663.98 | 1.40E-08 |
| GO:0001703 | gastrulation with mouth forming first | 64 | 45 | 25.12 | 4.30E-07 |
| GO:0006281 | DNA repair | 52 | 42 | 20.41 | 1.70E-06 |
| GO:0006260 | DNA replication | 48 | 41 | 18.84 | 1.80E-06 |
| GO:0000070 | mitotic sister chromatid segregation | 21 | 18 | 8.24 | 1.60E-05 |
| GO:0002119 | nematode larval development | 2230 | 969 | 875.1 | 4.10E-05 |
| GO:0000003 | reproduction | 2531 | 1153 | 993.22 | 0.00013 |
| GO:0007126 | meiosis | 213 | 144 | 83.59 | 0.00041 |
| GO:0006270 | DNA-dependent DNA replication initiation | 8 | 8 | 3.14 | 0.00056 |
| GO:0010948 | negative regulation of cell cycle proces... | 8 | 8 | 3.14 | 0.00056 |
| GO:0040007 | growth | 2925 | 1237 | 1147.84 | 0.00069 |
| GO:0007052 | mitotic spindle organization | 76 | 44 | 29.82 | 0.00073 |
| GO:0006470 | protein dephosphorylation | 106 | 58 | 41.6 | 0.00084 |
| mRNA Exit Up | | | | | |
| GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | p-value |
| GO:0018996 | molting cycle, collagen and cuticulin-ba... | 276 | 45 | 13.31 | 3.00E-13 |
| GO:0040011 | locomotion | 1692 | 140 | 81.63 | 3.80E-12 |
| GO:0010171 | body morphogenesis | 697 | 75 | 33.62 | 1.00E-10 |
| GO:0006508 | proteolysis | 382 | 43 | 18.43 | 1.40E-07 |
| GO:0040018 | positive regulation of multicellular org... | 369 | 39 | 17.8 | 2.80E-06 |
| GO:0040002 | collagen and cuticulin-based cuticle dev... | 100 | 15 | 4.82 | 8.10E-05 |
| GO:0006694 | steroid biosynthetic process | 12 | 5 | 0.58 | 0.00015 |
| mRNA Exit Down | | | | | |
| GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | p-value |
| GO:0006032 | chitin catabolic process | 31 | 10 | 1.52 | 1.30E-06 |
| GO:0055114 | oxidation-reduction process | 423 | 43 | 20.74 | 1.30E-05 |
| GO:0007218 | neuropeptide signaling pathway | 21 | 7 | 1.03 | 4.10E-05 |
| GO:0001508 | regulation of action potential | 7 | 4 | 0.34 | 0.00018 |
| GO:0009408 | response to heat | 52 | 10 | 2.55 | 0.00018 |

Tab. S-3 Die funktionelle Anreicherungsanalyse durch GO-Kategorien des biologischen Prozesses auf Protein-Ebene in *C. elegans*

| Protein Dauer Up | | | | | |
|--------------------|---|-----------|-------------|----------|----------|
| GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | p-value |
| GO:0006099 | tricarboxylic acid cycle | 12 | 9 | 2.02 | 1.40E-05 |
| GO:0006754 | ATP biosynthetic process | 38 | 16 | 6.4 | 0.00026 |
| GO:0030833 | regulation of actin filament polymerizat... | 11 | 7 | 1.85 | 0.00065 |
| Protein Dauer Down | | | | | |
| GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | p-value |
| GO:0006412 | translation | 181 | 110 | 40.62 | 3.30E-20 |
| GO:0009792 | embryo development ending in birth or eg... | 1327 | 385 | 297.79 | 4.40E-16 |
| GO:0002119 | nematode larval development | 1103 | 313 | 247.52 | 6.60E-10 |
| GO:0006457 | protein folding | 52 | 32 | 11.67 | 1.00E-09 |
| GO:0006418 | tRNA aminoacylation for protein translat... | 29 | 22 | 6.51 | 1.20E-09 |
| GO:0000003 | reproduction | 1126 | 313 | 252.68 | 1.30E-08 |
| GO:0040007 | growth | 1328 | 353 | 298.01 | 4.30E-07 |
| GO:0008340 | determination of adult lifespan | 345 | 108 | 77.42 | 2.80E-05 |
| GO:0015986 | ATP synthesis coupled proton transport | 28 | 16 | 6.28 | 6.80E-05 |
| GO:0006414 | translational elongation | 14 | 10 | 3.14 | 0.00012 |
| GO:0018996 | molting cycle, collagen and cuticulin-ba... | 153 | 54 | 34.33 | 0.00013 |
| Protein Exit Up | | | | | |
| GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | p-value |
| GO:0006412 | translation | 181 | 145 | 80.56 | 2.20E-19 |
| GO:0009792 | embryo development ending in birth or eg... | 1327 | 693 | 590.65 | 1.30E-15 |
| GO:0002119 | nematode larval development | 1103 | 580 | 490.95 | 1.50E-12 |
| GO:0000003 | reproduction | 1126 | 594 | 501.19 | 2.90E-10 |
| GO:0040010 | positive regulation of growth rate | 882 | 463 | 392.58 | 4.00E-09 |
| GO:0006898 | receptor-mediated endocytosis | 415 | 235 | 184.72 | 4.90E-08 |
| GO:0018996 | molting cycle, collagen and cuticulin-ba... | 153 | 93 | 68.1 | 2.30E-05 |
| GO:0040007 | growth | 1328 | 679 | 591.1 | 7.50E-05 |
| GO:0040035 | hermaphrodite genitalia development | 417 | 221 | 185.61 | 9.60E-05 |
| GO:0006364 | rRNA processing | 15 | 14 | 6.68 | 1.00E-04 |
| GO:0006418 | tRNA aminoacylation for protein translat... | 29 | 23 | 12.91 | 0.00013 |
| Protein Exit Down | | | | | |
| GO.ID | Term | Annotated | Significant | Expected | p-value |
| GO:0007160 | cell-matrix adhesion | 6 | 6 | 2.05 | 0.0016 |
| GO:0055114 | oxidation-reduction process | 220 | 98 | 75.32 | 0.004 |



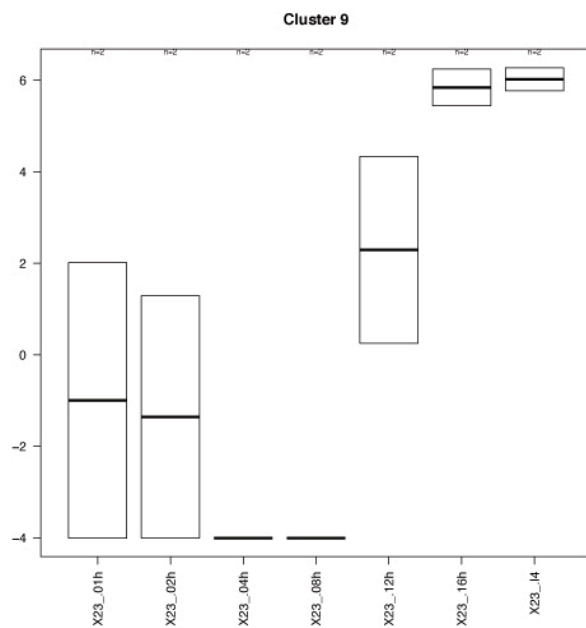
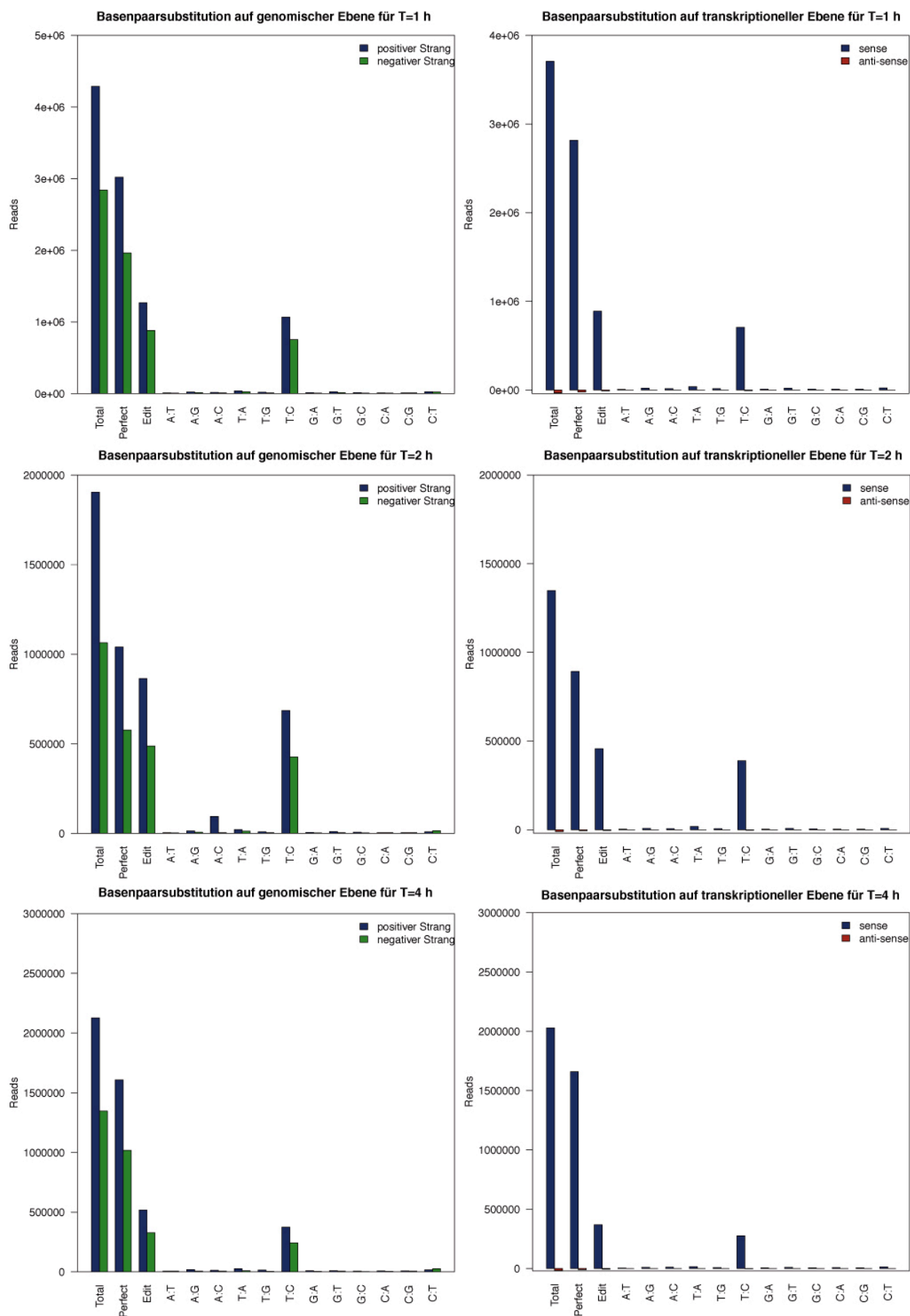


Abb. S-1 Boxplots von Cluster 1, 3 und 5-9 für die relative Protein-Mengenänderung beim Daueraustritt im label-freien Exp. 23

Die Anzahl der Proteine: Cluster 1 n=2010, Cluster 3 n=120, Cluster 5 n=73, Cluster 6 n=39, Cluster 7 n=38, Cluster 8 n=2 und Cluster 9 n=2



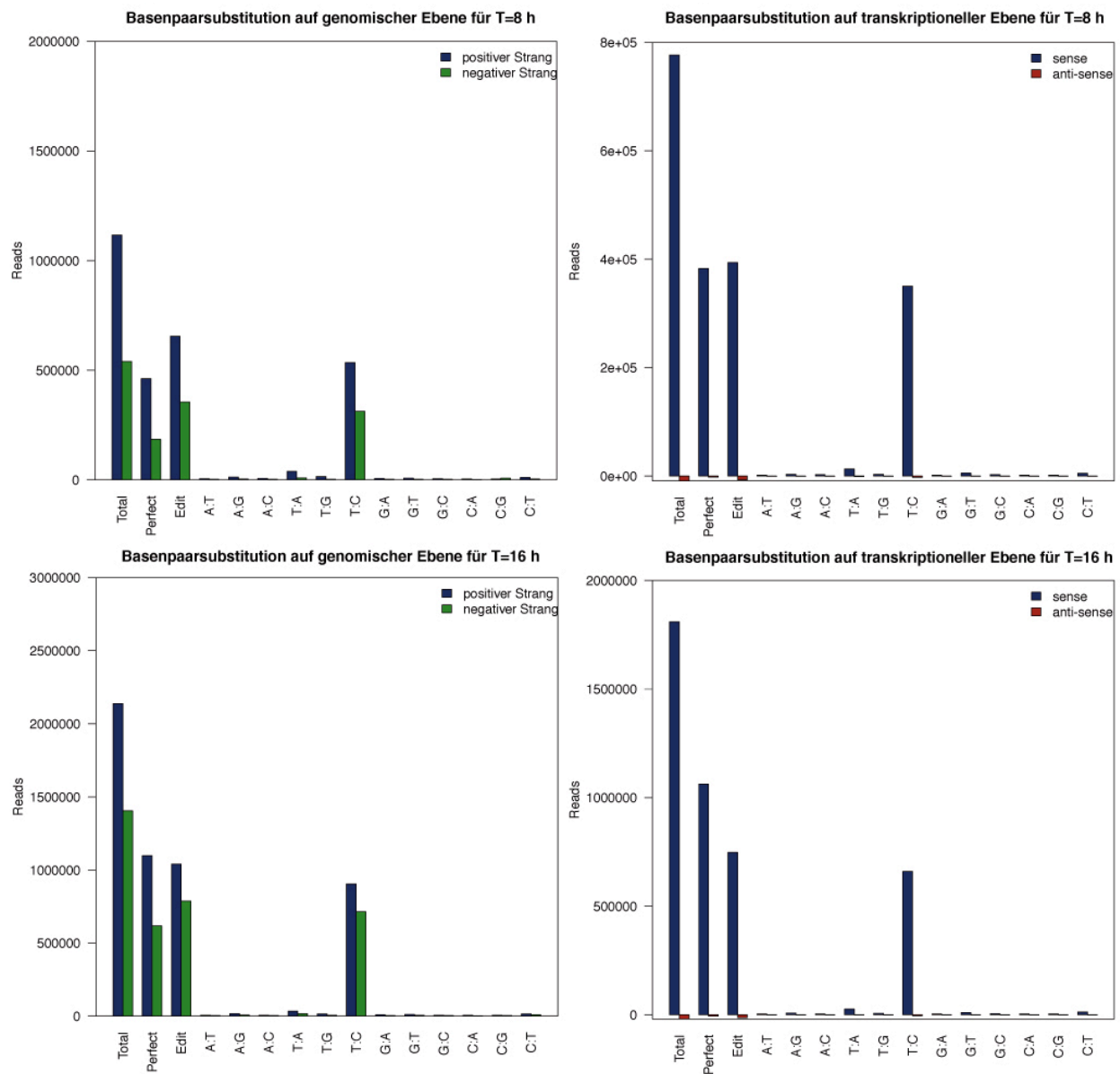
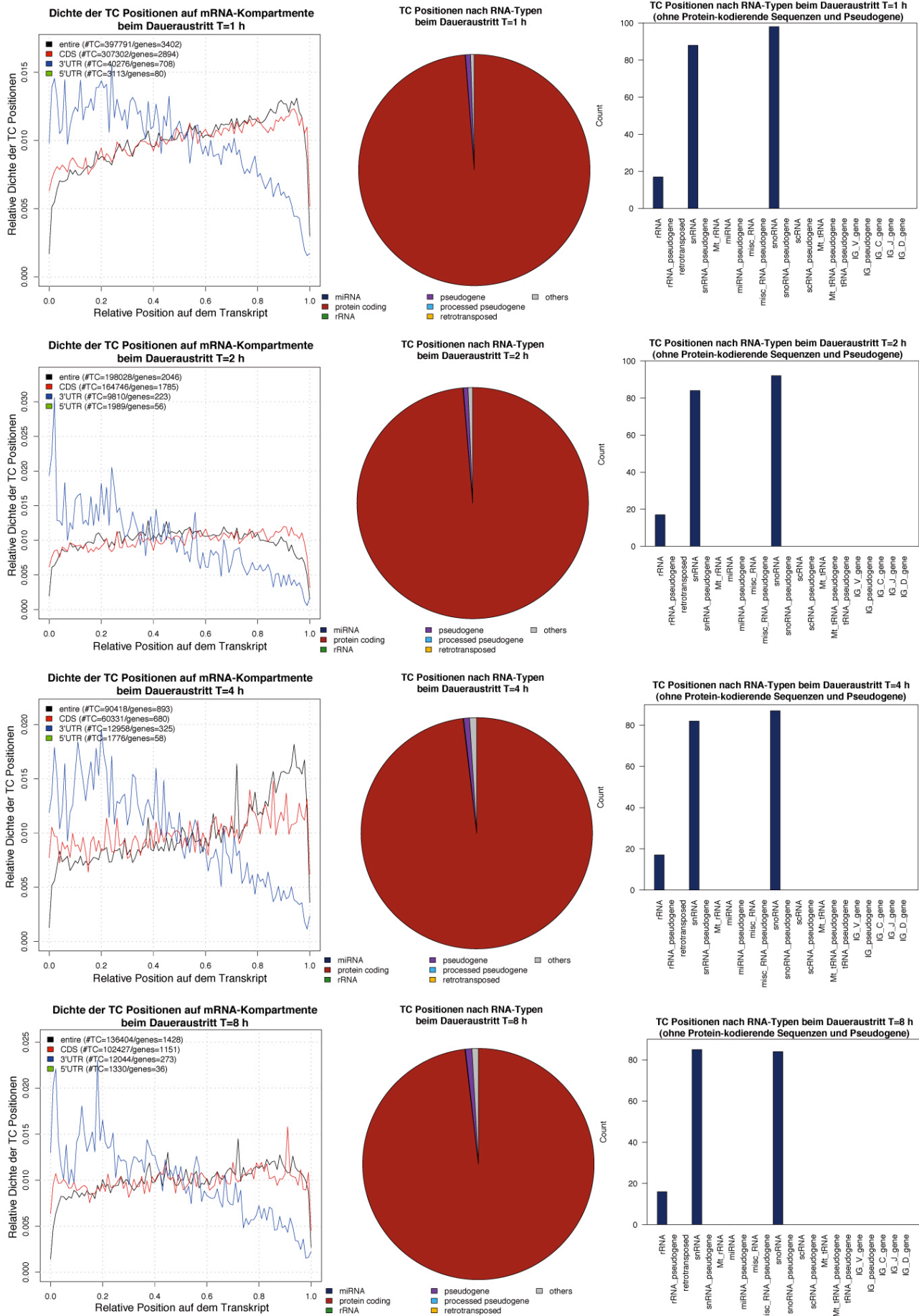


Abb. S-2 Auswertung des Read-Mappings vom popomR-Assay auf genomischer Ebene und auf transkriptioneller Ebene für das Daueraustritts-Experiment



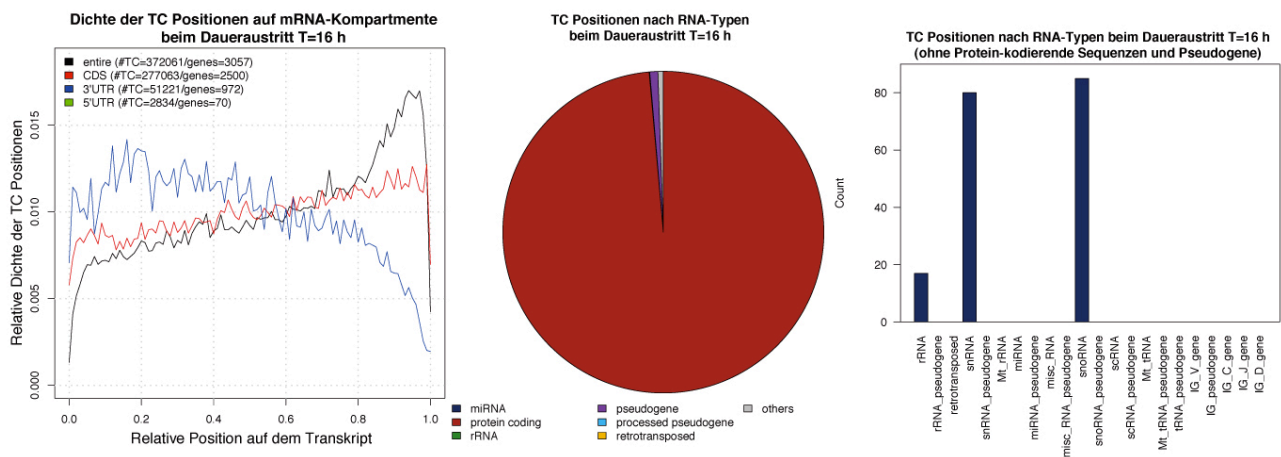


Abb. S-3 Verteilung der TC-Positionen auf mRNA-Kompartimente und nach RNA-Typen für das Daueraustritts-Experiment

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass diese Dissertation in dieser oder anderer Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde. Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin.

Zisong Chang

Berlin, 14. April. 2014